

## Anti-cancer and wound healing compounds

**Patent number:** CN1549722  
**Publication date:** 2004-11-24  
**Inventor:** STEPHEN QUIRK (US); WEART ILONA F (US)  
**Applicant:** KIMBERLY CLARK CO (US)  
**Classification:**  
- international: **C07K14/81**; A61K38/00; **C07K14/81**; A61K38/00; (IPC1-7): A61K38/00; A61K38/03; A61K38/04; A61K38/08; A61K38/10; A61K38/16  
- european: C07K14/81B4  
**Application number:** CN20020815135 20020815  
**Priority number(s):** US20010312726P 20010816; US20010032376 20011221; US20020153185 20020521

**Also published as:**



WO03018748 (A3)  
WO03018748 (A2)  
WO03016520 (A1)  
EP1513542 (A3)  
EP1513542 (A2)

Abstract not available for CN1549722

Abstract of corresponding document: **US2003148959**

The invention provides inhibitors of matrix metalloproteinases that are useful for encouraging the development of healthy skin and for treating wounds. The inhibitors are peptides having sequences related to cleavage regions of the proenzyme forms of matrix metalloproteinases. The peptide inhibitors of the invention can be formulated into therapeutic compositions, lotions, creams, skin covering and wound dressings that facilitate healing and healthy skin development, discourage scarring and wrinkling and ameliorate the effects of healing.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/00

A61K 38/03 A61K 38/04

A61K 38/08 A61K 38/10

A61K 38/16



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02815135.6

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549722A

[22] 申请日 2002.8.15 [21] 申请号 02815135.6

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 16 [33] US [31] 60/312,726

[32] 2001. 12. 21 [33] US [31] 10/032,376

[32] 2002. 5. 21 [33] US [31] 10/153,185

[86] 国际申请 PCT/US2002/026319 2002.8.15

[87] 国际公布 WO2003/018748 英 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.2

[71] 申请人 金伯利-克拉克环球有限公司

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 S·奎尔克 I·F·沃特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 徐雁漪

权利要求书 9 页 说明书 53 页 序列表 12 页  
附图 18 页

[54] 发明名称 抗癌并使创伤愈合的化合物

[57] 摘要

本发明提供用作抗肿瘤剂并用于治疗创伤的基质金属蛋白酶抑制剂。所述抑制剂为肽，肽的序列与基质金属蛋白酶的酶原形式的切割区有关。本发明的肽抑制剂可配制成抑制血管内皮生长因子表达并促进愈合的治疗组合物，洗液，乳膏，皮肤遮盖物和创伤敷料。

ISSN 1008-4274

1. 一种用于抑制血管内皮生长因子的表达的组合物, 含有有效量的式 I 的肽和药学上可接受的载体:



5 其中:  $\text{Xaa}_1$ ,  $\text{Xaa}_4$ , 和  $\text{Xaa}_6$  各自是非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_2$  是碱性氨基酸;

$\text{Xaa}_3$  是半胱氨酸样氨基酸;

$\text{Xaa}_5$  是极性或非脂族氨基酸;

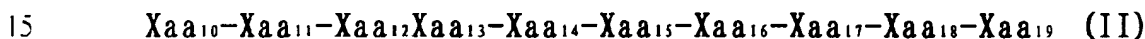
$\text{Xaa}_7$  是酸性氨基酸;

10  $\text{Xaa}_8$  是脂族或极性氨基酸;

$\text{Xaa}_9$  是脂族, 非极性或非碱性氨基酸; 且

其中所述肽可抑制血管内皮生长因子的表达。

2. 一种用于抑制血管内皮生长因子的表达的组合物, 含有有效量的式 II 的肽和药学上可接受的载体:



其中:

$\text{Xaa}_{10}$  是极性, 酸性, 碱性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{11}$  是极性或非芳族氨基酸;

$\text{Xaa}_{12}$  是极性, 碱性, 脂族或非极性氨基酸;

20  $\text{Xaa}_{13}$  是芳族, 脂族, 极性或非酸性氨基酸;

$\text{Xaa}_{14}$  是芳族, 非极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{15}$  是非极性或非酸性氨基酸;

$\text{Xaa}_{16}$  是碱性, 极性或非极性氨基酸;

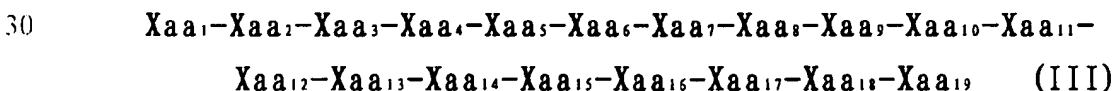
$\text{Xaa}_{17}$  是碱性, 极性, 脂族, 非极性或非酸性氨基酸;

25  $\text{Xaa}_{18}$  是非极性或非脂族氨基酸;

$\text{Xaa}_{19}$  是碱性或非脂族氨基酸; 且

其中所述肽可抑制血管内皮生长因子的表达。

3. 一种用于抑制血管内皮生长因子的表达的组合物, 含有有效量的式 III 的肽和药学上可接受的载体:



其中:

- Xaa<sub>1</sub>, Xaa<sub>4</sub>, 和 Xaa<sub>6</sub>各自是非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>2</sub>是碱性氨基酸;  
 Xaa<sub>3</sub>是半胱氨酸样氨基酸;  
 Xaa<sub>5</sub>是极性或非极性脂族氨基酸;  
 5 Xaa<sub>7</sub>是酸性氨基酸;  
 Xaa<sub>8</sub>是脂族或极性氨基酸;  
 Xaa<sub>9</sub>是脂族, 非极性或非极性碱性氨基酸;  
 Xaa<sub>10</sub>是极性, 酸性, 碱性或非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>11</sub>是极性或非极性芳香族氨基酸;  
 10 Xaa<sub>12</sub>是极性, 碱性, 脂族或非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>13</sub>是芳香族, 脂族, 极性或非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>14</sub>是芳香族, 非极性或非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>15</sub>是非极性或非极性酸性氨基酸;  
 Xaa<sub>16</sub>是碱性, 极性或非极性氨基酸;  
 15 Xaa<sub>17</sub>是碱性, 极性, 脂族, 非极性或非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>18</sub>是非极性或非极性脂族氨基酸;  
 Xaa<sub>19</sub>是碱性或非极性脂族氨基酸; 且

其中所述肽可抑制血管内皮生长因子的表达。

4. 一种用于抑制血管内皮生长因子的表达的组合物, 含有有效量  
 20 的式 IV 的肽和药学上可接受的载体:

Xaa<sub>a</sub>-Xaa<sub>b</sub>-Xaa<sub>c</sub>-Xaa<sub>d</sub>-Xaa<sub>e</sub>-Xaa<sub>f</sub>-Xaa<sub>g</sub>-Xaa<sub>h</sub>-Xaa<sub>i</sub>-Xaa<sub>j</sub>-Xaa<sub>k</sub>-  
 Xaa<sub>l</sub>-

Xaa<sub>a</sub>-Xaa<sub>b</sub>-Xaa<sub>c</sub>-Xaa<sub>d</sub>-Xaa<sub>e</sub>-Xaa<sub>f</sub>-Xaa<sub>g</sub>-Xaa<sub>h</sub>-Xaa<sub>i</sub>-Xaa<sub>j</sub>-Xaa<sub>k</sub>-Xaa<sub>l</sub>-

Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>-Xaa<sub>13</sub>-Xaa<sub>14</sub>-

25 Xaa<sub>15</sub>-Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Xaa<sub>19</sub> (IV)

(SEQ ID NO: 18)

- |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Xaa <sub>a</sub> 是脯氨酸;       | Xaa <sub>1</sub> 是脯氨酸;       |
| Xaa <sub>b</sub> 是谷氨酰胺或谷氨酸;  | Xaa <sub>2</sub> 是精氨酸;       |
| Xaa <sub>c</sub> 是苏氨酸;       | Xaa <sub>3</sub> 是半胱氨酸;      |
| 30 Xaa <sub>d</sub> 是甘氨酸;    | Xaa <sub>4</sub> 是甘氨酸;       |
| Xaa <sub>e</sub> 是天门冬氨酸或谷氨酸; | Xaa <sub>5</sub> 是缬氨酸或天门冬酰胺; |
| Xaa <sub>f</sub> 是亮氨酸;       | Xaa <sub>6</sub> 是脯氨酸;       |

- Xaa<sub>2</sub> 是 天 门 冬 氨酸 ; Xaa<sub>7</sub> 是 天 门 冬 氨酸 ;  
Xaa<sub>3</sub> 是 谷 氨 酰 胺 或 丝 氨酸 ; Xaa<sub>8</sub> 是 缬 氨酸 或 亮 氨酸 ;  
Xaa<sub>4</sub> 是 天 门 冬 酰 胺 或 丙 氨酸 ; Xaa<sub>9</sub> 是 丙 氨酸 或 甘 氨酸 ;  
Xaa<sub>5</sub> 是 苏 氨酸 ; Xaa<sub>10</sub> 是 天 门 冬 酰 胺 或 精 氨酸 ;  
5 Xaa<sub>6</sub> 是 异 亮 氨酸 或 亮 氨酸 ; Xaa<sub>11</sub> 是 酪 氨酸 或 苯 丙 氨酸 ;  
Xaa<sub>1</sub> 是 谷 氨酸 或 赖 氨酸 ; Xaa<sub>12</sub> 是 天 门 冬 酰 胺 或 谷 氨 酰 胺 ;  
Xaa<sub>13</sub> 是 苏 氨酸 或 丙 氨酸 ; Xaa<sub>13</sub> 是 苯 丙 氨酸 或 苏 氨酸 ;  
Xaa<sub>14</sub> 是 甲 硫 氨酸 ; Xaa<sub>14</sub> 是 苯 丙 氨酸 ;  
Xaa<sub>15</sub> 是 精 氨酸 ; Xaa<sub>15</sub> 是 脯 氨酸 或 谷 氨酸 ;  
10 Xaa<sub>16</sub> 是 赖 氨酸 或 苏 氨酸 ; Xaa<sub>16</sub> 是 精 氨酸 或 甘 氨酸 ;  
Xaa<sub>17</sub> 是 赖 氨酸 或 天 门 冬 氨酸 ; Xaa<sub>18</sub> 是 脯 氨酸 或 亮 氨酸 ;  
Xaa<sub>19</sub> 是 赖 氨酸 ; 且

其中所述肽可抑制血管内皮生长因子的表达。

5. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中非极性氨基酸  
15 是 甲 硫 氨酸, 甘 氨酸 或 脯 氨酸。

6. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中碱性氨基酸是  
组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2,3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -  
氨基苯丙氨酸, 和 2,4-二氨基丁酸。根据权利要求 1-4 任何一项所述  
的组合物, 其中半胱氨酸样氨基酸是半胱氨酸, 高半胱氨酸, 青霉胺,  
20 或  $\beta$ -甲基半胱氨酸。

7. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中脂族氨基酸是  
丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸,  
N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -  
丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸。

- 25 8. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中酸性氨基酸是  
天 门 冬 氨酸 或 谷 氨酸。

9. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中极性氨基酸是  
天 门 冬 酰 胺, 谷 氨 酰 胺, 丝 氨酸, 苏 氨酸, 酪 氨酸, 瓜 氨酸, N-乙 酰  
基 赖 氨酸, 甲 硫 氨酸 亚 砷, 或 高 丝 氨酸, 或 非 极 性 氨基酸, 如 甲 硫 氨  
30 酸, 甘 氨酸 或 脯 氨酸。

10. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中芳族氨基酸是  
苯 丙 氨酸, 酪 氨酸, 色 氨酸, 苯 甘 氨酸, 萘 丙 氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸,

1, 2, 3, 4-四氢-异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氯苯丙氨酸, 3-氯苯丙氨酸, 4-氯苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸。

11. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中所述肽还可抑制基质金属蛋白酶-1, 基质金属蛋白酶-3, 基质金属蛋白酶-4, 基质金属蛋白酶-5, 基质金属蛋白酶-6, 基质金属蛋白酶-7, 基质金属蛋白酶-8, 和基质金属蛋白酶-9, 基质金属蛋白酶-10, 基质金属蛋白酶-11, 基质金属蛋白酶-12, 或基质金属蛋白酶-13 中任何一种的蛋白酶活性。

12. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中抑制血管内皮生长因子的表达抑制肿瘤生长。

13. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中抑制血管内皮生长因子的表达减少肿瘤大小。

14. 根据权利要求 12 或 13 的组合物, 其中该肿瘤是转移的、非转移的、血管化的、非血管化的、硬的或软的。

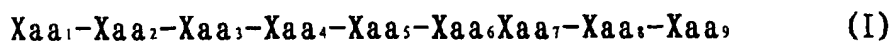
15. 根据权利要求 12 或 13 的组合物, 其中该肿瘤是血管化的或可以成为血管化的。

16. 根据权利要求 12 或 13 的组合物, 其中该肿瘤是神经胶质瘤、神经胶质肉瘤、退行性星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、脊索瘤、咽喉癌、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、睾丸肿瘤、肾母细胞瘤、尤因瘤、膀胱癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉瘤、乳头肉瘤、乳头腺肉瘤、囊腺肉瘤、支气管肺癌、髓样癌、肥大细胞瘤、间皮瘤、滑膜瘤、黑色素瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、寡突胶质细胞瘤、听神经瘤、成血管细胞瘤、脑膜瘤、松果体瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、上皮癌、胚胎癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、纤维肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤或白血病。

17. 根据权利要求 1-4 任何一项所述的组合物, 其中所述肽含有 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, 或 SEQ ID NO: 13。

18. 一种抗肿瘤组合物, 含有治疗有效量的含有 SEQ ID NO: 1, ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, 或 SEQ ID NO: 13 的肽和药学上可接受的载体, 其中所述肽可抑制血管内皮生长因子的表达。

19. 一种降低血管内皮生长因子表达的方法, 该方法包括使含有血管内皮生长因子的基因的细胞接触有效量的式 I 的肽:



其中:  $\text{Xaa}_1$ ,  $\text{Xaa}_4$ , 和  $\text{Xaa}_6$  各自是非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_2$  是碱性氨基酸;

$\text{Xaa}_3$  是半胱氨酸样氨基酸;

$\text{Xaa}_5$  是极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_7$  是酸性氨基酸;

$\text{Xaa}_8$  是脂族或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_9$  是脂族, 非极性或非极性氨基酸; 且

其中所述肽可抑制基质金属蛋白酶的活性。

20. 一种降低血管内皮生长因子表达的方法, 该方法包括使含有血管内皮生长因子的基因的细胞接触有效量的式 II 的肽:  $\text{Xaa}_{10}\text{-Xaa}_{11}\text{-Xaa}_{12}\text{-Xaa}_{13}\text{-Xaa}_{14}\text{-Xaa}_{15}\text{-Xaa}_{16}\text{-Xaa}_{17}\text{-Xaa}_{18}\text{-Xaa}_{19}$  (II)

其中:

$\text{Xaa}_{10}$  是极性, 酸性, 碱性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{11}$  是极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{12}$  是极性, 碱性, 脂族或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{13}$  是芳族, 脂族, 极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{14}$  是芳族, 非极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{15}$  是非极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{16}$  是碱性, 极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{17}$  是碱性, 极性, 脂族, 非极性或非极性氨基酸;

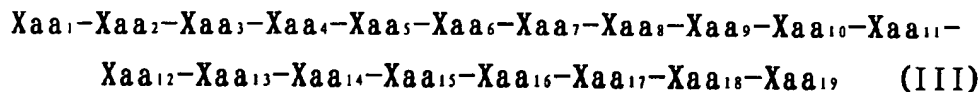
$\text{Xaa}_{18}$  是非极性或非极性氨基酸;

$\text{Xaa}_{19}$  是碱性或非极性氨基酸; 且

其中所述肽可抑制基质金属蛋白酶的活性。

21. 一种降低血管内皮生长因子表达的方法, 该方法包括使含有

血管内皮生长因子的基因的细胞接触有效量的式 III 的肽:

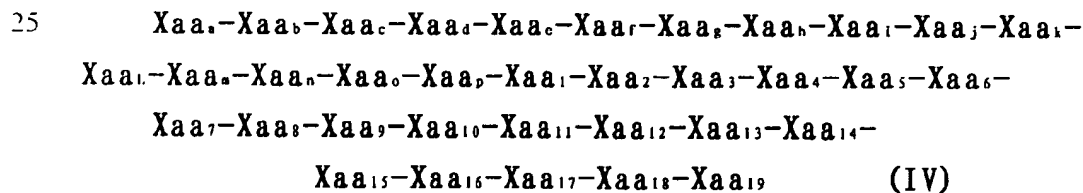


其中：

- 5 Xaa<sub>1</sub>, Xaa<sub>4</sub>, 和 Xaa<sub>6</sub>各自是非极性氨基酸;  
Xaa<sub>2</sub>是碱性氨基酸;  
Xaa<sub>3</sub>是半胱氨酸样氨基酸;  
Xaa<sub>5</sub>是极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>7</sub>是酸性氨基酸;  
10 Xaa<sub>8</sub>是脂族或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>9</sub>是脂族, 非极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>10</sub>是极性, 酸性, 碱性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>11</sub>是极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>12</sub>是极性, 碱性, 脂族或非极性氨基酸;  
15 Xaa<sub>13</sub>是芳族, 脂族, 极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>14</sub>是芳族, 非极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>15</sub>是非极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>16</sub>是碱性, 极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>17</sub>是碱性, 极性, 脂族, 非极性或非极性氨基酸;  
20 Xaa<sub>18</sub>是非极性或非极性氨基酸;  
Xaa<sub>19</sub>是碱性或非极性氨基酸; 且

其中所述肽可抑制基质金属蛋白酶的活性。

22. 一种降低血管内皮生长因子表达的方法, 该方法包括使含有血管内皮生长因子的基因的细胞接触有效量的式 IV 的肽:



(SEQ ID NO: 18)

- 30      Xaa<sub>a</sub> 是脯氨酸;                      Xaa<sub>1</sub> 是脯氨酸;  
          Xaa<sub>b</sub> 是谷氨酰胺或谷氨酸;        Xaa<sub>2</sub> 是精氨酸;  
          Xaa<sub>c</sub> 是苏氨酸;                    Xaa<sub>3</sub> 是半胱氨酸;



- |    |                               |                                |
|----|-------------------------------|--------------------------------|
|    | Xaa <sub>4</sub> 是甘氨酸;        | Xaa <sub>4</sub> 是甘氨酸;         |
|    | Xaa <sub>5</sub> 是天门冬氨酸或谷氨酸;  | Xaa <sub>5</sub> 是缬氨酸或天门冬酰胺;   |
|    | Xaa <sub>6</sub> 是亮氨酸;        | Xaa <sub>6</sub> 是脯氨酸;         |
|    | Xaa <sub>7</sub> 是天门冬氨酸;      | Xaa <sub>7</sub> 是天门冬氨酸;       |
| 5  | Xaa <sub>8</sub> 是谷氨酰胺或丝氨酸;   | Xaa <sub>8</sub> 是缬氨酸或亮氨酸;     |
|    | Xaa <sub>9</sub> 是天门冬酰胺或丙氨酸;  | Xaa <sub>9</sub> 是丙氨酸或甘氨酸;     |
|    | Xaa <sub>10</sub> 是苏氨酸;       | Xaa <sub>10</sub> 是天门冬酰胺或精氨酸;  |
|    | Xaa <sub>11</sub> 是异亮氨酸或亮氨酸;  | Xaa <sub>11</sub> 是酪氨酸或苯丙氨酸;   |
|    | Xaa <sub>12</sub> 是谷氨酸或赖氨酸;   | Xaa <sub>12</sub> 是天门冬酰胺或谷氨酰胺; |
| 10 | Xaa <sub>13</sub> 是苏氨酸或丙氨酸;   | Xaa <sub>13</sub> 是苯丙氨酸或苏氨酸;   |
|    | Xaa <sub>14</sub> 是甲硫氨酸;      | Xaa <sub>14</sub> 是苯丙氨酸;       |
|    | Xaa <sub>15</sub> 是精氨酸;       | Xaa <sub>15</sub> 是脯氨酸或谷氨酸;    |
|    | Xaa <sub>16</sub> 是赖氨酸或苏氨酸;   | Xaa <sub>16</sub> 是精氨酸或甘氨酸;    |
|    | Xaa <sub>17</sub> 是赖氨酸或天门冬氨酸; | Xaa <sub>17</sub> 是脯氨酸或亮氨酸;    |
| 15 | Xaa <sub>18</sub> 是赖氨酸; 且     |                                |

其中所述肽可抑制基质金属蛋白酶的活性。

23. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中所述肽含有 SEQ ID NO: 1, ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, 或 SEQ ID NO: 13.

24. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中所述肽含有 SEQ ID NO: 11.

25. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中非极性氨基酸是甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸.

26. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中碱性氨基酸是组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -氨基苯丙氨酸, 和 2, 4-二氨基丁酸.

27. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中半胱氨酸样氨基酸是半胱氨酸, 高半胱氨酸, 青霉胺, 或  $\beta$ -甲基半胱氨酸.

28. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中脂族氨基酸是丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -

丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或 $\alpha$ -氨基异丁酸。

29. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中酸性氨基酸是天门冬氨酸或谷氨酸。

30. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中极性氨基酸是  
5 天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸。

31. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 其中芳族氨基酸是苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 苯甘氨酸, 萘丙氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸,  
10 酸, 1, 2, 3, 4-四氢-异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氟苯丙氨酸, 3-氟苯丙氨酸, 4-氟苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸。

32. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法, 该方法进一步包括将肽局部给予哺乳动物中的肿瘤。

33. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中该肿瘤是转移的、非转移  
15 的、血管化的、非血管化的、硬的或软的。

34. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中该肿瘤是血管化的或可以成为血管化的。

35. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中该肿瘤是神经胶质瘤、神经胶质肉瘤、退行性星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、脊索瘤、咽喉癌、卡波西肉瘤、淋巴  
20 管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、睾丸肿瘤、肾母细胞瘤、尤文瘤、膀胱癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉瘤、乳头肉瘤、乳头腺肉瘤、囊腺肉瘤、支气管肺癌、髓样癌、肥大细胞瘤、间皮瘤、滑膜瘤、黑色素瘤、平滑  
25 肌肉瘤、横纹肌瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、寡突胶质细胞瘤、听神经瘤、成血管细胞瘤、脑膜瘤、松果体瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、上皮癌、胚胎癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、纤维肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤或白血病。

36. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中抑制血管内皮生长因子的  
30 表达抑制肿瘤生长。

37. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中抑制血管内皮生长因子的

表达减少肿瘤大小。

38. 根据权利要求 32 所述的方法，其中抑制血管内皮生长因子的抑制肿瘤的血管化。

39. 根据权利要求 19-22 任何一项所述的方法，其中给予所述肽  
5 以防止或治疗过多的血管发生。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中过多的血管发生包括糖尿病视网膜病、早发性视网膜病、角膜移植物排斥、新血管性青光眼、晶体后纤维组织增生、流行性角结膜炎、维生素 A 缺乏、隐形眼镜佩戴过度、特应性角膜炎、上缘角膜炎、干燥性翼状胬肉角膜炎、干燥  
10 综合征、红斑痤疮、phlyctenulosis、梅毒、眼部新血管疾病、分支杆菌感染、脂变性、化学灼伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯疱疹感染、带状疱疹感染、原生动物感染、莫伦溃疡、卡波西肉瘤、Terrien 边缘变性、边缘角质层分离、类风湿性关节炎、系统性狼疮、多动脉炎、创伤、Wegener 结节病、巩膜炎、Steven's Johnson 病、类天疱  
15 疮、放射状角膜切开术、角膜移植物排斥、黄斑变性、镰状细胞贫血、结节病、梅毒、弹性膜假黄瘤、佩吉特病、静脉阻塞、动脉阻塞、颈动脉阻塞性疾病、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎、莱姆病、系统性红斑狼疮、伊尔斯病、贝切特病、视网膜炎、脉络膜炎、眼部组织胞浆菌病、贝斯特病、近视、视凹陷、斯塔加特病、pars planitis、慢性视网膜脱落、高粘度综合征、弓形体病、激光治疗后并发症、潮红或增殖性玻  
20 璃体视网膜病。

## 抗癌并使创伤愈合的化合物

本申请是 2002 年 5 月 21 日提交的美国专利申请系列号  
5 10/153,185 和 2001 年 12 月 21 日提交的美国专利申请系列号  
10/032,376 的继续部分申请,这两篇申请都要求了 2001 年 8 月 16 日  
提交的美国临时专利申请系列号 60/312,726 的优先权,上述所有申请  
全文引入此处作为参考。

## 发明领域

10 本发明涉及可用于使创伤愈合并用作抗肿瘤剂的含基质金属蛋白  
酶抑制剂的制剂。所述抑制剂为肽,肽的序列与基质金属蛋白酶的酶  
原形式的切割位点有关。

## 发明背景

在许多对损伤、中风和肿瘤形成的生物学反应中,血管发生或在体  
15 内产生新血管的过程,是一个关键的步骤。当进行血管发生刺激时,  
内皮细胞重新进入细胞周期,迁移,从细胞周期中撤回以及接着再次  
分化而形成功能上适于其组织环境的新血管。进行血管发生的内皮细  
胞降解在下面的基底膜并迁移,形成伸出到血管周围基质中的毛细血  
管芽。Ausprunk 等, Microvasc. Rev., 14: 51-65 (1977)。在大多  
20 数细胞中,血管发生处于一系列协同作用的氧敏感蛋白的严格控制之  
下,从而防止过多的血管形成的。

血管发生的一种关键蛋白介质是血管内皮生长因子(VEGF),即血  
管生长的一种强效刺激剂。血管内皮生长因子是一种具有两个由二硫  
键连接的 23 kDa 亚基的二聚体糖蛋白。人们认为血管内皮生长因子影  
25 响细胞内钙的转移、纤溶酶原激活物的诱导、纤溶酶原激活物抑制剂 1  
的合成、内皮细胞中己糖转运的刺激以及单核细胞迁移的体外促进。  
由不同的 mRNA 剪接变体编码的四个 VEGF 同工型似乎是同样地能够刺  
激内皮细胞有丝分裂的发生。每个同工型对细胞表面的蛋白聚糖具有  
不同的亲和性;所述蛋白聚糖起 VEGF 的低亲和性受体的作用。VEGF  
30 的 121 个氨基酸的同工型和 165 个氨基酸的同工型(VEGF121 和  
VEGF165)以可溶的形式被分泌出来,而 189 个氨基酸残基的同工型和  
206 个氨基酸残基的同工型则保持与细胞表面的结合,且对肝素具有强

亲和性。

已表征了血管内皮生长因子的两种高亲和性受体。这些受体是 VEGFR-1/Flt-1 (fms 样酪氨酸激酶-1) 和 VEGFR-2/Kdr/Flk-1 (包含受体/胎肝激酶-1 的激酶插入域)。把这样的受体分类为 PDGF 受体家族中的成员；但它们有 7 个而非 5 个在其胞外域中的免疫球蛋白样环，且它们具有比通常在这个家族中观察到的激酶插入片段长的激酶插入片段。虽然某些 VEGF 受体可以出现在单核细胞和黑素瘤细胞上，但 VEGF 受体的表达主要发生在血管内皮细胞中。已报道了仅仅内皮细胞才反应于 VEGF 而增殖，且不同来源的内皮细胞可显示出不同的反应。

10 VEGF 表达的方式提示，它参与正常血管系统的发育与维持，且参与肿瘤的血管发生。在鼠发育期间，在性交后 (p. c.) 的全部 7.5 天里，内胚层表达 VEGF；且室神经外胚层在毛细血管向内生长阶段产生 VEGF。参见 Breier 等, Development, 114: 521-523 (1992)。在鹌鹑发育的第二天，卵黄囊形成血管的区域以及整个胚胎都显示出 VEGF 的表  
15 达。另外，成年小鼠中的靠近帘式内皮膜的表皮细胞，显示出 VEGF 的持续表达；这提示一种在保持这种特定内皮表型与功能方面的作用。

肿瘤细胞常常以高于正常细胞的 3 至 10 倍的水平表达 VEGF。除此之外还证明了肿瘤的生长与转移是依赖血管发生的。Folkman 等, J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992)。因此，需要有能够抑制  
20 VEGF 表达及/或活性的试剂。

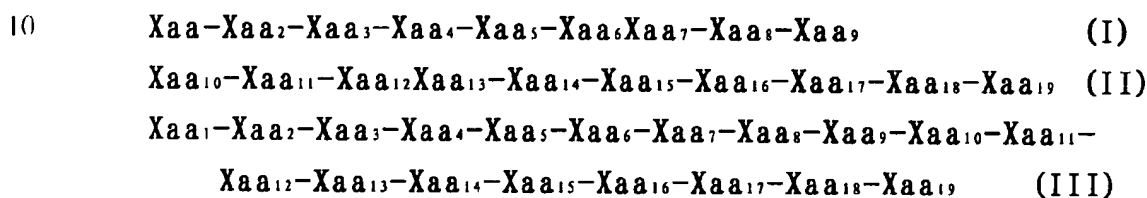
#### 发明概述

本发明提供减少血管内皮生长因子表达的抗血管发生组合物及方法。对于各种各样的治疗目的，这样的方法与组合物是有用的。例如，可以用本发明的组合物与方法来治疗包括实体瘤的癌症。除此之外还  
25 证明了所述组合物与方法对治疗组织损伤是有用的，所述组织损伤包括创伤、手术切口、慢性创伤、心脏病、中风等等。本发明的肽不仅抑制金属蛋白酶，而且减少血管内皮生长因子的表达。考虑了各种各样的局部洗剂、敷料以及肠胃外和非肠胃外给药的组合物，以及用所述肽来抑制肿瘤生长和发生的方法。

30 因此，本发明涉及基质金属蛋白酶的肽抑制剂。这些肽抑制剂的氨基酸序列与跨基质金属蛋白酶两个球形结构域的连接区相同或相关。某些类型的基质金属蛋白酶及其序列是已知的，包括基质金属蛋

白酶-1, 基质金属蛋白酶-2, 基质金属蛋白酶-3, 基质金属蛋白酶-4, 基质金属蛋白酶-5, 基质金属蛋白酶-6, 基质金属蛋白酶-7, 基质金属蛋白酶-8, 和基质金属蛋白酶-9, 基质金属蛋白酶-10, 基质金属蛋白酶-11, 基质金属蛋白酶-12, 和基质金属蛋白酶-13. 本发明考虑了  
5 所含氨基酸序列来源于所述基质金属蛋白酶任何一个的连接区的抑制剂。例如, 本发明肽抑制剂的氨基酸序列可来源于基质金属蛋白酶-2 序列 (SEQ ID NO: 14) 中从约氨基酸 70 到约氨基酸 120 的任何区, 和所有其它基质金属蛋白酶的类似区。

本发明提供式 (I), (II), (III) 任何一个的肽:



其中

- 15  $\text{Xaa}_1$ ,  $\text{Xaa}_4$ , 和  $\text{Xaa}_6$  各自是非极性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_2$  是碱性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_3$  是半胱氨酸样氨基酸;  
 $\text{Xaa}_5$  是极性或非脂族氨基酸;  
 $\text{Xaa}_7$  是酸性氨基酸;
- 20  $\text{Xaa}_8$  是脂族或极性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_9$  是脂族, 非极性或非碱性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{10}$  是极性, 酸性, 碱性或非极性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{11}$  是极性或非芳族氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{12}$  是极性, 碱性, 脂族或非极性氨基酸;
- 25  $\text{Xaa}_{13}$  是芳族, 脂族, 极性或非酸性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{14}$  是芳族, 非极性或非极性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{15}$  是非极性或非酸性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{16}$  是碱性, 极性或非极性氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{17}$  是碱性, 极性, 脂族, 非极性或非酸性氨基酸;
- 30  $\text{Xaa}_{18}$  是非极性或非脂族氨基酸;  
 $\text{Xaa}_{19}$  是碱性或非脂族氨基酸; 且

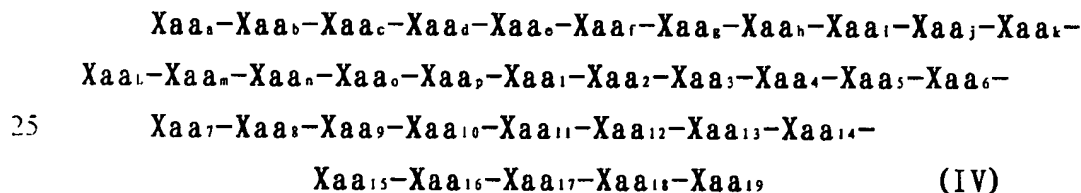
其中所述肽能够抑制基质金属蛋白酶-1, 基质金属蛋白酶-2, 基质金

属蛋白酶-3, 基质金属蛋白酶-4, 基质金属蛋白酶-5, 基质金属蛋白酶-6, 基质金属蛋白酶-7, 基质金属蛋白酶-8, 或基质金属蛋白酶-9, 基质金属蛋白酶-10, 基质金属蛋白酶-11, 基质金属蛋白酶-12, 和基质金属蛋白酶-13 的活性。在某些实施方案中, 所述肽可抑制基质金属蛋白酶-2, 基质金属蛋白酶-3, 基质金属蛋白酶-7, 基质金属蛋白酶-8, 或基质金属蛋白酶-9 的活性。

非极性氨基酸可以是, 例如, 甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸。碱性氨基酸, 例如, 可以是组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2,3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -氨基苯丙氨酸, 或 2,4-二氨基丁酸。本发明的半胱氨酸样氨基酸包括, 例如, 半胱氨酸, 高半胱氨酸, 青霉胺, 或  $\beta$ -甲基半胱氨酸。

脂族氨基酸包括, 例如, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸。酸性氨基酸包括, 例如, 天门冬氨酸或谷氨酸。极性氨基酸包括, 例如, 天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸。本发明的芳族氨基酸可以是, 例如, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 苯甘氨酸, 萘丙氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸, 1,2,3,4 四氢-异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氟苯丙氨酸, 3-氟苯丙氨酸, 4-氟苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸。

本发明还提供式 (IV) 的肽 (SEQ ID NO: 18):



其中:

Xaa <sub>1</sub> 是脯氨酸;	Xaa <sub>1</sub> 是脯氨酸;
Xaa <sub>2</sub> 是谷氨酰胺或谷氨酸;	Xaa <sub>2</sub> 是精氨酸;
Xaa <sub>3</sub> 是苏氨酸;	Xaa <sub>3</sub> 是半胱氨酸;
Xaa <sub>4</sub> 是甘氨酸;	Xaa <sub>4</sub> 是甘氨酸;
Xaa <sub>5</sub> 是天门冬氨酸或谷氨酸;	Xaa <sub>5</sub> 是缬氨酸或天门

- 5 Xaa<sub>7</sub> 是亮氨酸;  
Xaa<sub>8</sub> 是天门冬氨酸;  
Xaa<sub>9</sub> 是谷氨酰胺或丝氨酸;  
Xaa<sub>10</sub> 是天门冬酰胺或丙氨酸;  
Xaa<sub>11</sub> 是苏氨酸;
- 10 Xaa<sub>12</sub> 是异亮氨酸或亮氨酸;  
Xaa<sub>13</sub> 是谷氨酸或赖氨酸;  
Xaa<sub>14</sub> 是苏氨酸或丙氨酸;
- 15 Xaa<sub>15</sub> 是甲硫氨酸;  
Xaa<sub>16</sub> 是精氨酸;  
Xaa<sub>17</sub> 是赖氨酸或苏氨酸;  
Xaa<sub>18</sub> 是赖氨酸或天门冬氨酸;  
Xaa<sub>19</sub> 是赖氨酸; 且
- 20 其中所述肽能够抑制金属蛋白酶的活性。例如, 所述基质金属蛋白酶可以是基质金属蛋白酶-1, 基质金属蛋白酶-2, 基质金属蛋白酶-3, 基质金属蛋白酶-4, 基质金属蛋白酶-5, 基质金属蛋白酶-6, 基质金属蛋白酶-7, 基质金属蛋白酶-8, 和基质金属蛋白酶-9, 基质金属蛋白酶-10, 基质金属蛋白酶-11, 基质金属蛋白酶-12, 或基质金属蛋白酶-13。优选的肽可抑制基质金属蛋白酶-2 或基质金属蛋白酶-9。
- 25 可以衍生本发明肽抑制剂的连接区具有例如 SEQ ID NO:14 的约 70-到约 120 位的氨基酸, 和其它基质金属蛋白酶的类似区。在某些实施方案中, 本发明肽抑制剂具有 SEQ ID NO:14 的约 77 到约 110 位的氨基酸序列, 和其它基质金属蛋白酶的类似区。某些肽抑制剂的例子
- 30 包括含有氨基酸序列 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, 或 SEQ ID NO:13 的那些。

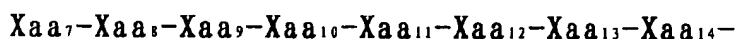
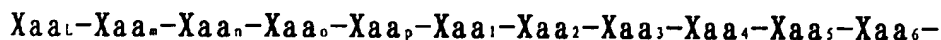
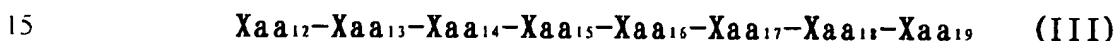
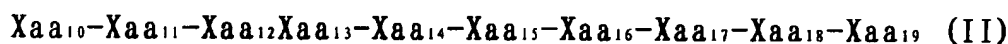
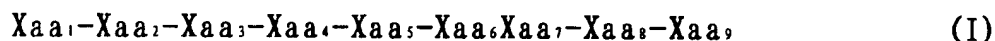
冬酰胺;  
Xaa<sub>6</sub> 是脯氨酸;  
Xaa<sub>7</sub> 是天门冬氨酸;  
Xaa<sub>8</sub> 是缬氨酸或亮氨酸;  
Xaa<sub>9</sub> 是丙氨酸或甘氨酸;  
Xaa<sub>10</sub> 是天门冬酰胺或精氨酸;  
Xaa<sub>11</sub> 是酪氨酸或苯丙氨酸;  
Xaa<sub>12</sub> 是天门冬酰胺或谷氨酰胺;  
Xaa<sub>13</sub> 是苯丙氨酸或苏氨酸;  
Xaa<sub>14</sub> 是苯丙氨酸;  
Xaa<sub>15</sub> 是脯氨酸或谷氨酸;  
Xaa<sub>16</sub> 是精氨酸或甘氨酸;  
Xaa<sub>18</sub> 是脯氨酸或亮氨酸;



本发明的肽对不同的基质金属蛋白酶具有不同的亲和性。例如，在其中一个实施方案中，所述肽抑制剂可以约  $1.0\mu\text{M}$ -约  $500.0\mu\text{M}$  的  $k_i$  值抑制基质金属蛋白酶-2。在另一实施方案中，所述肽抑制剂可以约  $1.0\mu\text{M}$ - $400.0\mu\text{M}$  的  $k_i$  值抑制基质金属蛋白酶-2。在另一实施方案中，所述肽抑制剂可以约  $1.0\mu\text{M}$ -约  $50.0\mu\text{M}$  的  $k_i$  值抑制基质金属蛋白酶-2。

本发明进一步提供含有治疗有效量的本发明的肽和药学上可接受载体的组合物，该组合物能够减少血管内皮生长因子的表达。所述组合物可用于治疗各种癌症、肿瘤和其它疾病。

10 本发明进一步提供用于治疗创伤或使老化作用逆转的方法，包括给予治疗有效量的式 I，II，III 或 IV 的肽：



20 (SEQ ID NO : 21)

其中：

$\text{Xaa}_1$ ,  $\text{Xaa}_4$ , 和  $\text{Xaa}_6$  各自是非极性氨基酸；

$\text{Xaa}_2$  是碱性氨基酸；

$\text{Xaa}_3$  是半胱氨酸样氨基酸；

25  $\text{Xaa}_5$  是极性或非脂族氨基酸；

$\text{Xaa}_7$  是酸性氨基酸，

$\text{Xaa}_8$  是脂族或极性氨基酸；

$\text{Xaa}_9$  是脂族，非极性或非碱性氨基酸；和

$\text{Xaa}_{10}$  是极性，酸性，碱性或非极性氨基酸；

30  $\text{Xaa}_{11}$  是极性或非芳族氨基酸；

$\text{Xaa}_{12}$  是极性，碱性，脂族或非极性氨基酸；

$\text{Xaa}_{13}$  是芳族，脂族，极性或非酸性氨基酸；

- Xaa<sub>14</sub>是芳族, 非极性或极性氨基酸;  
 Xaa<sub>15</sub>是非极性或酸性氨基酸;  
 Xaa<sub>16</sub>是碱性, 极性或非极性氨基酸;  
 Xaa<sub>17</sub>是碱性, 极性, 脂族, 非极性或酸性氨基酸;  
 5 Xaa<sub>18</sub>是非极性或脂族氨基酸;  
 Xaa<sub>19</sub>是碱性或脂族氨基酸;  
 Xaa<sub>20</sub>是脯氨酸;  
 Xaa<sub>21</sub>是谷氨酰胺或谷氨酸;  
 Xaa<sub>22</sub>是苏氨酸;  
 10 Xaa<sub>23</sub>是甘氨酸;  
 Xaa<sub>24</sub>是天门冬氨酸或谷氨酸;  
 Xaa<sub>25</sub>是亮氨酸;  
 Xaa<sub>26</sub>是天门冬氨酸;  
 Xaa<sub>27</sub>是谷氨酰胺或丝氨酸;  
 15 Xaa<sub>28</sub>是天门冬酰胺或丙氨酸;  
 Xaa<sub>29</sub>是苏氨酸;  
 Xaa<sub>30</sub>是异亮氨酸或亮氨酸;  
 Xaa<sub>31</sub>是谷氨酸或赖氨酸;  
 Xaa<sub>32</sub>是苏氨酸或丙氨酸;  
 20 Xaa<sub>33</sub>是甲硫氨酸;  
 Xaa<sub>34</sub>是精氨酸;  
 Xaa<sub>35</sub>是赖氨酸或苏氨酸;

其中所述肽能够抑制基质金属蛋白酶的活性。

- 本发明肽中的非极性氨基酸可以是, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸。  
 25 碱性氨基酸可以是, 例如, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2,3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -氨基苯丙氨酸, 和 2,4-二氨基丁酸。  
 半胱氨酸样氨基酸可以是, 例如, 半胱氨酸, 高半胱氨酸, 青霉胺, 或  $\beta$ -甲基半胱氨酸。  
 脂族氨基酸可以是, 例如, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸,  
 30 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸。  
 酸性氨基酸可以是, 例如, 天门冬氨酸或谷氨酸。  
 极性氨基酸可以是天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸,

瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸。芳族氨基酸是苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 苯甘氨酸, 茶丙氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸, 1, 2, 3, 4-四氢-5-异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氯苯丙氨酸, 3-氯苯丙氨酸, 4-氯苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸。

在另一实施方案中, 本发明提供治疗创伤或改善老化作用的方法, 包括给予治疗有效量的 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, 或 SEQ ID NO: 13 的肽。

本发明的肽的其它可能的临床应用领域包括特征在于过多血管发生的疾病。所述疾病的例子是黄斑变性和糖尿病视网膜病。

#### 附图说明

图 1 提供所选 MMP 酶原的切割跨越区的 CLUSTAL X™ (1.8 版本) 多重序列比对。图 1A 提供突出显示保守残基的序列比对, 其中 ‘\*’ 表示序列之间完全相同, ‘:’ 表示 7/9 保守位置, ‘.’ 表示与大多数保守取代相比, 有超过 80% 的位置相同。图 1B 中的粗体表示异质性的位置。

图 2 提供 MMP-1 酶原的结构 (蛋白质数据库档案 1FBL.ENT)。表 1 所示 SEQ ID NOS: 2-10 的区域跨越了两个大结构域之间的短区。该区在活化过程中切割。

图 3 提供 MMP-9 的三维模型。产生活性蛋白酶 N-末端的切割区用交叉阴影线表示。两个锌离子用球形表示。切割结构域肽可与其在酶原中的标准位置附近的 MMP 结合。这种结合 (也接近催化锌) 可空间位阻性阻断活性位点的一部分。这种阻断可阻碍底物结合。

图 4 举例说明利用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 切割结构域肽对 MMP-9 活性的抑制。MMP-9 是在进行 FRET 测定之前与 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽混合的。19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的浓度如下: 0mM (实心圆形), 0.01mM (空心圆形), 0.03mM (实心正方形), 0.06mM (空心正方形), 0.125mM (实心三角形), 0.25mM (空心三角形), 0.5mM (x's), 1mM (倒实心三角形), 2mM (倒空心三角形)。

图 5 举例说明利用 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 切割结构域肽对 MMP-

9 活性的抑制。MMP-9 是在进行 FRET 测定之前与 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 肽混合的。10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 肽的浓度如下: 0mM(实心三角形), 0.25mM(空心三角形), 0.5mM(空心倒三角形), 1.0mM(实心倒三角形), 2.0mM(x' s)。

5 图 6 举例说明利用 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 切割结构域肽对 MMP-9 活性的抑制。MMP-9 是在进行 FRET 测定之前与 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽混合的。9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽的浓度如下: 0mM(实心三角形), 0.25mM(空心三角形), 0.5mM(空心倒三角形), 1.0mM(实心倒三角形), 2.0mM(x' s)。

10 图 7 举例说明利用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 切割结构域肽对 MMP-9 活性的抑制。MMP-9 是在进行荧光胶原测定之前与 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽混合的。19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的浓度如下: 0mM(实心圆形), 0.06mM(空心菱形), 0.1mM(空心正方形), 0.25mM(空心圆形), 0.5mM(x' s)。

15 图 8 举例说明利用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 切割结构域肽对 MMP-9 活性的抑制。MMP-9 是在进行荧光胶原测定之前与 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽混合的。19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的浓度如下: 0mM(实心圆形), 0.06mM(空心菱形), 0.1mM(空心正方形), 0.25mM(空心圆形), 0.5mM(x' s)。

20 图 9 举例说明利用 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 切割结构域肽对 MMP-9 活性的长时间抑制。MMP-9 是在进行荧光胶原测定之前, 与 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 肽混合的。10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 肽的浓度如下: 0mM(空心圆形), 0.1mM(空心菱形), 0.2mM(空心正方形), 0.4mM(x' s)。

25 图 10 举例说明利用 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 切割结构域肽对 MMP-9 活性的长时间抑制。MMP-9 是在进行荧光胶原测定之前与 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽混合的。9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽的浓度如下: 0mM(实心圆形), 0.06mM(空心菱形), 0.1mM(空心正方形), 0.25mM(空心圆形), 0.5mM(x' s)。

30 图 11 提供典型剪接反应的 HPLC 洗脱曲线。箭头表示随着反应过程的进行, 第一个峰 (MMP-9 酶原的峰) 的面积减少, 其次的两个峰 (分别为成熟的 MMP-9 和 N-末端切割产物) 的面积增加。

图 12 举例说明利用基质溶素 (stromilysin) 将 MMP-9 酶原转化成 N-末端和 C-末端结构域。MMP-9 酶原与基质溶素在 0 (实心圆形), 0.5  $\mu$ M (空心正方形) 或 1.0  $\mu$ M (实心正方形) 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽存在的条件下反应。在指定时间除去等分试样, 然后进行 HPLC。求 MMP 酶原峰面积的积分, 并把零时间点的样品设为 100%。空心圆形表示在没有基质溶素或 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的缓冲液中温育的 MMP 酶原。

图 13A 提供 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 抑制剂肽与 MMP-9 相互作用的等温滴定量热分析。各峰表示通过注射以及随后的结合反应所产生的热量。图 13B 提供通过相对于时间求图 13A 各注射峰值的积分所产生的结合等温线。

图 14 提供 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 抑制剂肽与 MMP-2 相互作用的等温滴定量热分析。图 14A 提供 25  $^{\circ}$ C 时, 在 20mM 二甲胍酸盐 (pH6.8), 10mM NaCl 中, 将 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) (1mM) 滴定成 MMP2 (20  $\mu$ M) 的原始等温量热数据。各峰表示通过注射以及随后的结合反应所产生的热量。图 14B 提供通过相对于时间求图 14A 各注射峰值的积分所产生的结合等温线。

图 15 提供当 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽在固定的 MMP-9 的表面上流过时, 所产生的表面等离子共振结合等温线。

图 16 提供用两种浓度的肽进行治疗后, 与阳性对照组相比, 皮肤模型中活细胞百分比的柱状图。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 处理过的第一份样品为阳性对照, 可用于确立代表 100% 存活的细胞数。第二份样品是阴性对照, 其中的细胞与 1% Triton-X100 接触, 表示该测定法可检测细胞的死亡。接下来的三份样品是浓度为 500  $\mu$ M 的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11), 10 聚体 (SEQ ID NO: 13), 和 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽。最后三份样品是浓度为 2mM 的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11), 10 聚体 (SEQ ID NO: 13), 和 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽。所给出的数据代表三次试验的平均值。

图 17 以图形的形式描述了 db/db 糖尿病小鼠中, 创伤愈合的时间过程。该图表示对于用标准盐水 (空心圆形) 或 20  $\mu$ g/mL 19 聚体肽 (SEQ ID NO: 11) (实心圆形) 处理过的小鼠而言, 相对的平均创伤面积与创伤后的天数。所给出的数据表示 10 只受试动物的平均相对创伤直

径。

图 18 举例说明, 与未处理细胞相比, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽显著抑制或阻遏 VEGF 表达。该图提供了含有用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽和已知刺激或抑制 VEGF 表达的试剂处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物的 2% 琼脂糖凝胶的照片。第 1 道提供了 DNA 标记。第 2 道提供了未处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物 (阴性对照)。第 3 道提供了用已知刺激 VEGF 表达的 5  $\mu$ L 100  $\mu$ M 的氯化钴 ( $\text{CoCl}_2$ ) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物, 并且因此用作阳性对照。第 4 道提供了用来自已知增加血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达的缺氧可诱导的因子 1 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (ODD) 的肽处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。第 5 道提供了用用于将来自缺氧可诱导的因子 1 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (ODD) 的肽转运至成纤维细胞中的 TAP Express™ (Gene Therapy Systems, CA) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。第 6 道提供了用 200  $\mu$ L 10mg/ml 的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。如图中所示, 阴性对照 (未处理的成纤维细胞) 产生了微弱但容易分辨的 VEGF 带。氯化钴的使用与对照组相比提供了增加的 VEGF 表达。然而, 出乎意料的结果是用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽处理的成纤维细胞中的 VEGF 表达被完全抑制。

图 19 进一步举例说明, 与未处理细胞相比, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽显著抑制或阻遏 VEGF 表达。该图提供了含有用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽和已知刺激或抑制 VEGF 表达的试剂处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物的 2% 琼脂糖凝胶的照片。第 1 道提供了 DNA 标记。第 2 和 3 道提供了来自未处理的成纤维细胞的重复实验的 PCR RT 产物 (阴性对照)。第 4 和 5 道提供了用已知刺激 VEGF 表达的 5  $\mu$ L 100  $\mu$ M 的氯化钴 ( $\text{CoCl}_2$ ) 处理的成纤维细胞的重复实验的 PCR RT 产物, 并且因此用作阳性对照。第 6 和 7 道提供了用来自已知增加血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达的缺氧可诱导的因子 1 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (ODD) 的肽处理的成纤维细胞的重复实验的 PCR RT 产物。第 8 和 9 道提供了用 200  $\mu$ L 10mg/ml 的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 处理的成纤维细胞的重复实验的 PCR RT 产物。如图中所示, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽再次完全抑制了成纤维细胞中的 VEGF 表达。

图 20 也举例说明, 与未处理细胞相比, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11)

肽显著抑制或阻遏 VEGF 表达。该图提供了含有用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽和已知刺激或抑制 VEGF 表达的试剂处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物的 2% 琼脂糖凝胶的照片。第 1 道提供了 DNA 标记。第 2 道提供了用已知刺激 VEGF 表达的 5  $\mu$ L 100  $\mu$ M 的氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物, 并且因此用作阳性对照, 其中使用了由 VEGF、 $\beta$  肌动蛋白和 GAPDH 组成的引物混合物。第 3 道提供了未处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物 (阴性对照)。第 4 道提供了用已知刺激 VEGF 表达的 5  $\mu$ L 100  $\mu$ M 的氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物, 并且因此用作阳性对照。第 5 道提供了用用于将来自缺氧可诱导的因子 1 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (ODD) 的肽转运至成纤维细胞中的 TAP Express™ (Gene Therapy Systems, CA) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。第 6 道提供了用来自已知增加血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达的缺氧可诱导的因子 1 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (ODD) 的肽处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。第 7 道提供了用用于将来自缺氧可诱导的因子 1 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (ODD) 的肽转运至成纤维细胞中的 TAP Express™ (Gene Therapy Systems, CA) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。第 8 道提供了用 200  $\mu$ L 10mg/ml 的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 处理的成纤维细胞的 PCR RT 产物。如图中所示, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽再次完全抑制了成纤维细胞中的 VEGF 表达。

## 20 发明详述

本发明提供可用于阻遏血管内皮生长因子表达的基质金属蛋白酶抑制剂, 用于抑制肿瘤生长和发展并且用于促进创伤愈合。

基质金属蛋白酶是作为无活性的酶原在体内产生的。酶原的蛋白酶切割可导致成熟基质金属蛋白酶的活化及形成。切割下来的肽序列是在蛋白的最氨基末端发现的, 长度约为 100-110 个氨基酸的酶原前导序列。根据本发明, 这些酶原前导肽可阻断基质金属蛋白酶的活性位点并抑制基质金属蛋白酶的活性。基质金属蛋白酶的酶原前导肽的给药可降低胞外基质破坏的速度, 并提供更快速的创伤愈合。

大多数抑制策略都包括使用有机小分子阻碍基质金属蛋白酶的酶活性。这些化合物对于机体常常是有毒的, 而且不是天然存在的分子。使用天然肽抑制活化的基质金属蛋白酶可提供更高层次的蛋白酶控制, 而且没有毒副作用。与小分子抑制策略不同, 本发明的肽可用于

同时抑制全部或单个基质金属蛋白酶种类的活化。所述肽可被随意引入到皮肤上，引入到创伤环境中，或通过皮肤遮盖物或创伤敷料而被固定，或递送。

- 5 本发明提供对酶原活性水平的更高程度控制，从而使慢性创伤愈合并改善老化作用。例如，由于在慢性创伤愈合过程中需要一定量的蛋白酶水平(Agren 等, 1999)，本领域的技术人员可选择仅仅部分抑制蛋白酶活性。通过调节所用抑制剂肽的类型和量，可控制基质金属蛋白酶抑制的程度。

#### 肽

- 10 根据本发明，所含序列与切割位点区中的基质金属蛋白酶酶原前导序列有关的肽可用于抑制许多类型基质金属蛋白酶的活性。基质金属蛋白酶酶原前导序列的切割位置在酶原氨基酸序列的大约 110 位氨基酸处。本发明肽抑制剂的序列与酶原氨基酸 70 位-大约 120 位内的任何区有关。这种肽可抑制许多类型基质金属蛋白酶的活性。本发明的肽还可阻碍酶原基质金属蛋白酶的活化，并抑制成熟基质金属蛋白酶的酶活性。
- 15 所含序列在各种基质金属蛋白酶中更加保守的肽，例如，所含序列朝向切割区 N-末端侧的肽，可用于提供普遍有效拮抗各种基质金属蛋白酶的抑制剂。然而，所含序列保守程度较低的肽，例如，所含序列朝向切割区 C-末端侧的肽，可用于提供对单个基质金属蛋白酶特异的抑制剂。
- 20

因此，本发明考虑了可作为基质金属蛋白酶抑制剂的，所含序列来源于基质金属蛋白酶任何酶原前导区的肽，还考虑了其中一个或多个氨基酸取代了天然存在于基质金属蛋白酶中的氨基酸的变体肽。还考虑了具有不同序列的肽的混合物。

- 25 通常，配制肽，肽变体和肽混合物，并以使防止肿瘤形成、肿瘤减少、创伤愈合或健康组织再生达到最佳的方式使用。因此，只要能够抑制肿瘤发展并且促进愈合，就可改变本发明的肽组合物和制剂，从而获得更低或更高水平的抑制。

- 30 肽抑制剂的大小可以改变。通常，仅仅约有 5 个氨基酸的肽太小，以致不能提供最佳的抑制。然而，超过大约 8-9 个氨基酸的肽就足够长，以提供抑制。因此，虽然全长并不是关键性的，但本发明中常使用长于 8 个氨基酸的肽。本发明所用的其它肽长于 9 个氨基酸。本发



明使用的其它肽长于 10 个氨基酸。此外，本发明还使用了长于约 15 个氨基酸的肽。

- 肽的大小没有特定的上限。然而一般说来，使用较短的肽比使用较长的肽更便宜。因此，本发明的肽抑制剂通常短于约 100 个氨基酸。
- 5 本发明所用的许多肽抑制剂都短于约 50 个氨基酸。本发明所用的其它肽抑制剂短于约 30 个氨基酸。还可使用短于约 25 个氨基酸的肽。同样，本发明还可使用短于约 23 个氨基酸的肽。用于进行本发明的肽的例子是具有 19 个氨基酸的 SEQ ID NO:11。

- 表 1 提供了来源于酶原氨基酸约 70 位-约 120 位的若干代表性基质金属蛋白酶的序列。
- 10

表 1: 基质金属蛋白酶切割区的序列

MMP	序列	SEQ ID
mmp2	MQKFFGLPQTGDLDQNTIETMRKPRCGNPDVA NYNFFPRKPKWD	NO:2
mmp13	MQSFFGLEVTGKLDDNTLDVMKKPRCGVPDV GEYNVFPRTLKWSKMNLTY	NO:3
mmp7	MQKFFGLPETGKLSRVMEIMQKPRCGVPDVA EFSLMPNSPKWHSRTVTYRIVSYT	NO:4
mmp3	MQKFLGLEVTGKLDSDTLEVMRKPRCGVPDV GHFRTFPGIPKWRKTHLTYRIVN	NO:5
mmp10	MQKFLGLEVTGKLDTDLEVMRKPRCGVPDV GHFSSFGMPKWRKTHLTYRIVNY	NO:6
mmp12	MQHFLGLKVTGQLDTSTLEMMHAPRCGVPDV HHFREMPGGPVWRKHYITYRINN	NO:7
mmp9	LQKQLSLPETGELDSATLKAMRTPRCGVPLG RFQTFEGDLKWHHHN	NO:8
mmp1	MQEFGKLVTKGPKDAETLKVMKQPRCGVPDV AQFVLTEGNPRWEQTHLTYRIEN	NO:9
mmp8	MQRFFGLNVTGKPNEETLDMMKKPRCGVPDS GGFMLTPGNPKWERTNLTYRIRNY	NO:10

- 表 1 所列的各个肽，以及具有 SEQ ID NO:1, 11, 12 和 13 的肽被考虑为本发明的肽抑制剂。此外，具有 SEQ ID NO:1-13 任何一个的肽变体和肽衍生物也可用作肽抑制剂。这种肽变体和衍生物可具有一个
- 15

或多个氨基酸的取代, 缺失, 插入或其它修饰, 只要所述肽变体或衍生物可抑制基质金属蛋白酶。

5 分离肽的氨基酸残基可以是上述任何一个的, 遗传编码的 L-氨基酸, 天然存在的非遗传编码的 L-氨基酸, 合成的 L-氨基酸或 D-对映异构体。这里所用的 20 个遗传编码的 L-氨基酸和通用非编码的氨基酸的符号是传统约定的, 并在表 2 中列出。

表 2

氨基酸	一个字母的符号	通用的缩写
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天门冬酰胺	N	Asn
天门冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
甲硫氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val
$\beta$ -丙氨酸		BAla
2, 3-二氨基丙酸		Dpr
$\alpha$ -氨基异丁酸		Aib

N-甲基甘氨酸 (肌氨酸)		MeGly
鸟氨酸		Orn
瓜氨酸		Cit
叔-丁基丙氨酸		t-BuA
叔-丁基甘氨酸		t-BuG
N-甲基异亮氨酸		MeIle
苯甘氨酸		Phg
环己基丙氨酸		Cha
正亮氨酸		Nle
萘丙氨酸		Na1
吡啶丙氨酸		
3-苯并噻吩丙氨酸		
4-氯苯丙氨酸		Phe (4-Cl)
2-氟苯丙氨酸		Phe (2-F)
3-氟苯丙氨酸		Phe (3-F)
4-氟苯丙氨酸		Phe (4-F)
青霉胺		Pen
1, 2, 3, 4-四氢-异喹啉-3-羧酸		Tic
$\beta$ -2-噻吩丙氨酸		Thi
甲硫氨酸亚砷		MSO
高精氨酸		hArg
N-乙酰基赖氨酸		AcLys
2, 4-二氨基丁酸		Dbu
$p$ -氨基苯丙氨酸		Phe ( $pNH_2$ )
N-甲基缬氨酸		MeVal
高半胱氨酸		HCys
高丝氨酸		HSer
$\epsilon$ -氨基己酸		Aha
$\delta$ -氨基戊酸		Ava
2, 3-二氨基丁酸		Dab

可使用具有相似化学和/或物理性质的氨基酸取代包括在本发明

范围内的肽的一个或多个氨基酸，只要这些变体或衍生的肽仍保留有抑制基质金属蛋白酶的活性，刺激成纤维细胞或角质形成细胞的细胞生长，或刺激成纤维细胞的细胞迁移的能力。

- 彼此可以取代的氨基酸通常存在于相似的种类或亚类中。正如本领域技术人员已知的，氨基酸可分成三个主要的种类：亲水氨基酸，疏水氨基酸和半胱氨酸样氨基酸，这主要取决于氨基酸侧链的性质。这些主要种类又可进一步分成亚类。亲水氨基酸包括具有酸性，碱性或极性侧链的氨基酸，疏水氨基酸包括具有芳族或非极性侧链的氨基酸。非极性氨基酸又可进一步细分成，包括除其它之外的脂族氨基酸。这里所用氨基酸种类的定义如下：

“疏水氨基酸”是指侧链在生理 pH 值下不带电，而且被水溶液排斥的氨基酸。遗传编码的疏水氨基酸的例子包括 Ile, Leu 和 Val。非遗传编码的疏水氨基酸的例子包括 t-BuA。

- “芳族氨基酸”是指侧链含有至少一个具有共轭  $\pi$ -电子体系的环（芳基）的疏水氨基酸。芳基可进一步被取代基，如烷基，烯基，炔基，羟基，磺酰基，硝基和氨基等取代。遗传编码的芳族氨基酸的例子包括苯丙氨酸，酪氨酸和色氨酸。常见的非遗传编码的芳族氨基酸包括苯甘氨酸，2-萘丙氨酸， $\beta$ -2-噻吩丙氨酸，1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸，4-氯苯丙氨酸，2-氯苯丙氨酸，3-氯苯丙氨酸和 4-氯苯丙氨酸。

“非极性氨基酸”是指侧链在生理 pH 值下通常不带电，而且是非极性的疏水氨基酸。遗传编码的非极性氨基酸的例子包括甘氨酸，脯氨酸和甲硫氨酸。非编码的非极性氨基酸的例子包括 Cha。

- “脂族氨基酸”是指具有饱和或不饱和的直链，支链或环状烃侧链的非极性氨基酸。遗传编码的脂族氨基酸的例子包括 Ala, Leu, Val 和 Ile。非编码的脂族氨基酸的例子包括 Nle。

“亲水氨基酸”是指侧链被水溶液吸引的氨基酸。遗传编码的亲水氨基酸的例子包括 Ser 和 Lys。非编码的亲水氨基酸的例子包括 Cit 和 hCys。

- “酸性氨基酸”是指侧链 pK 值小于 7 的亲水氨基酸。酸性氨基酸通常具有因为失去氢离子而在生理 pH 值下带负电的侧链。遗传编码的酸性氨基酸的例子包括天门冬氨酸(天门冬氨酸盐)和谷氨酸(谷氨酸

盐)。

“碱性氨基酸”是指侧链  $pK$  值大于 7 的亲水氨基酸。碱性氨基酸通常具有因为与水合氢离子缔合而在生理 pH 下带正电的侧链。遗传编码的碱性氨基酸的例子包括精氨酸, 赖氨酸和组氨酸。非遗传编码的碱性氨基酸的例子包括非-环状氨基酸鸟氨酸, 2, 3 二氨基丙酸, 2, 4-二氨基丁酸和高精氨酸。

“极性氨基酸”是指侧链在生理 pH 值下不带电的亲水氨基酸, 但在它所具有的键中, 通常由两个原子共有的电子对被其中一个原子更紧密地占有。遗传编码的极性氨基酸的例子包括天门冬酰胺和谷氨酰胺。非遗传编码的极性氨基酸的例子包括瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸和甲硫氨酸亚砷。

“半胱氨酸样氨基酸”是指侧链能够与另外一个氨基酸残基的侧链形成共价键, 如二硫键的氨基酸。通常, 半胱氨酸样氨基酸的侧链含有至少一个巯基 (SH)。遗传编码的半胱氨酸样氨基酸的例子包括半胱氨酸。非遗传编码的半胱氨酸样氨基酸的例子包括高半胱氨酸和青霉胺。

本领域那些技术人员应认识到, 上述分类不是绝对的。很多氨基酸都具有不止一种性质, 并因此可被包括在不止一个种类中。例如, 酪氨酸既具有芳环又具有极性羟基。因此, 酪氨酸具有双重性质, 可包括在芳族和极性类中。同样, 除了能够形成二硫键外, 半胱氨酸还具有非极性的特性。因此, 虽然不能被严格分为疏水或非极性氨基酸, 但在很多情况下, 半胱氨酸可用于赋予肽疏水性。

一些常见的氨基酸, 即, 它不是遗传编码的, 而且存在于本发明的肽及肽类似物中, 或取代本发明肽及肽类似物中的氨基酸, 包括, 但不限制于,  $\beta$ -丙氨酸 (b-Ala) 和其它  $\omega$ -氨基酸, 如 3-氨基丙酸 (Dap), 2, 3-二氨基丙酸 (Dpr), 4-氨基丁酸等;  $\alpha$ -氨基异丁酸 (Aib);  $\epsilon$ -氨基己酸 (Aha);  $\delta$ -氨基戊酸 (Ava); 甲基甘氨酸 (MeGly); 鸟氨酸 (Orn); 瓜氨酸 (Cit); 叔-丁基丙氨酸 (t-BuA); 叔-丁基甘氨酸 (t-BuG); N-甲基异亮氨酸 (MeIle); 苄甘氨酸 (Phg); 环己基丙氨酸 (Cha); 正亮氨酸 (Nle); 2-萘丙氨酸 (2-Nal); 4-氯苄丙氨酸 (Phe(4-Cl)); 2-氟苄丙氨酸 (Phe(2-F)); 3-氟苄丙氨酸 (Phe(3-F)); 4-氟苄丙氨酸 (Phe(4-F)); 青霉胺 (Pen); 1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-

- 羧酸(Tic);  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸(Thi); 甲硫氨酸亚砷(MSO); 高精氨酸(hArg); N-乙酰基赖氨酸(AcLys); 2,3-二氨基丁酸(Dab); 2,3-二氨基丁酸(Dbu);  $p$ -氨基苯丙氨酸(Phe( $p$  NH<sub>2</sub>)); N-甲基缬氨酸(MeVal); 高半胱氨酸(hCys)和高丝氨酸(hSer)。这些氨基酸也落在
- 5 上面定义的种类中。

- 上述遗传编码的和非编码的氨基酸的分类在下面的表 3 中概括。应当理解表 3 仅仅用于举例说明, 而不意味着对可构成这里所述的肽和肽类似物的氨基酸残基的穷举。用于制备这里所述的肽和肽类似物的其它氨基酸残基可在, 例如, Fasman, 1989, CRC Practical Handbook
- 10 of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc., 和这里引用的参考文献中找到。对于这里没有具体提到的氨基酸, 可通过与具体鉴定过的氨基酸的已知行为和/或它们的化学和/或物理性质进行比较而常规分到上述种类中。

表 3

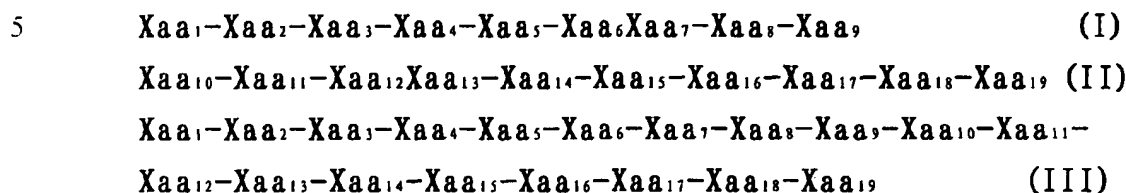
15

分类	遗传编码的	非遗传编码的
疏水的		
芳族	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe(4-Cl), Phe(2-F), Phe(3-F), Phe(4-F), 吡啶 Ala, 苯并噻吩 Ala
非极性	M, G, P	
脂族	A, V, L, I	t-BuA, t-BuG, MeIle, Nle, MeVal, Cha, bAla, MeGly, Aib
亲水的		
酸性	D, E	
碱性	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe( $p$ -NH <sub>2</sub> ), DBU, A <sub>2</sub> BU
极性	Q, N, S, T, Y	Cit, AcLys, MSO, hSer
半胱氨酸样	C	Pen, hCys, $\beta$ -甲基 Cys

本发明肽的任何氨基酸都可被任何相似分类的氨基酸取代, 从而

产生变体或衍生肽，只要肽的变体或衍生物仍保留有抑制基质金属蛋白酶活性的能力。

在其中一个实施方案中，本发明的肽抑制剂包括肽式 I, II 或 III 的任何一个。



其中

10  $\text{Xaa}_1$ ,  $\text{Xaa}_4$ , 和  $\text{Xaa}_6$  各自是非极性氨基酸，例如，甲硫氨酸，甘氨酸或脯氨酸；

$\text{Xaa}_2$  是碱性氨基酸，例如，组氨酸，赖氨酸，精氨酸，2,3-二氨基丙酸，鸟氨酸，高精氨酸， $\rho$ -氨基苯丙氨酸，和 2,4-二氨基丁酸；

15  $\text{Xaa}_3$  是半胱氨酸样氨基酸，例如，半胱氨酸，高半胱氨酸，青霉胺，或  $\beta$ -甲基半胱氨酸；

$\text{Xaa}_5$  是极性或非脂族氨基酸，例如，极性氨基酸，如天门冬酰胺，谷氨酰胺，丝氨酸，苏氨酸，酪氨酸，瓜氨酸，N-乙酰基赖氨酸，甲硫氨酸亚砷，或高丝氨酸，或非脂族氨基酸，如丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，叔-丁基丙氨酸，叔-丁基丙氨酸，N-甲基异亮氨酸，  
20 正亮氨酸，N-甲基缬氨酸，环己基丙氨酸， $\beta$ -丙氨酸，N-甲基甘氨酸，或  $\alpha$ -氨基异丁酸；

$\text{Xaa}_7$  是酸性氨基酸，例如，天门冬氨酸或谷氨酸；

$\text{Xaa}_8$  是脂族或极性氨基酸，例如脂族氨基酸，如丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，叔-丁基丙氨酸，叔-丁基丙氨酸，甲基异亮氨酸，  
25 正亮氨酸，N-甲基缬氨酸，环己基丙氨酸， $\beta$ -丙氨酸，N-甲基甘氨酸，或  $\alpha$ -氨基异丁酸，或极性氨基酸，如天门冬酰胺，谷氨酰胺，丝氨酸，苏氨酸，酪氨酸，瓜氨酸，N-乙酰基赖氨酸，甲硫氨酸亚砷，或高丝氨酸；

$\text{Xaa}_9$  是脂族，非极性或非碱性氨基酸，例如，脂族氨基酸，如丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，叔-丁基丙氨酸，叔-丁基丙氨酸，  
30 N-甲基异亮氨酸，正亮氨酸，N-甲基缬氨酸，环己基丙氨酸， $\beta$ -丙氨酸，N-甲基甘氨酸，或  $\alpha$ -氨基异丁酸，非极性氨基酸，如甲硫氨酸，

甘氨酸或脯氨酸, 或碱性氨基酸, 如组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -氨基苯丙氨酸, 和 2, 4-二氨基丁酸;

- 5 Xaa<sub>10</sub> 是极性, 酸性, 碱性或非极性氨基酸, 例如, 极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 酸性氨基酸, 如天门冬氨酸或谷氨酸, 碱性氨基酸, 如组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -氨基苯丙氨酸, 和 2, 4-二氨基丁酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸;

- 10 Xaa<sub>11</sub> 是极性或芳族氨基酸, 例如, 极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或芳族氨基酸, 如苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 苯甘氨酸, 萘丙氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸, 1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氟苯丙氨酸, 3-氟苯丙氨酸, 4-氟苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸;

- 15 Xaa<sub>12</sub> 是极性, 碱性, 脂族或非极性氨基酸, 例如, 极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或碱性氨基酸, 如组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $\rho$ -氨基苯丙氨酸, 和 2, 4-二氨基丁酸, 或脂族氨基酸, 如丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸;

- 20 Xaa<sub>13</sub> 是芳族, 脂族, 极性或酸性氨基酸, 例如, 芳族氨基酸, 如苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 苯甘氨酸, 萘丙氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸, 1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氟苯丙氨酸, 3-氟苯丙氨酸, 4-氟苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸, 或脂族氨基酸, 如丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸, 或极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或酸性氨基酸, 如天



门冬氨酸或谷氨酸;

Xaa<sub>14</sub> 是芳族, 非极性或极性氨基酸, 例如, 芳族氨基酸, 如苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 苯甘氨酸, 萘丙氨酸,  $\beta$ -2-噻吩丙氨酸, 1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸, 4-氯苯丙氨酸, 2-氯苯丙氨酸, 3-氯苯丙氨酸, 4-氯苯丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 或 3-苯并噻吩丙氨酸, 或非极性或极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸, 或极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸;

Xaa<sub>15</sub> 是非极性或酸性氨基酸, 例如, 非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸, 或酸性氨基酸如天门冬氨酸或谷氨酸;

Xaa<sub>16</sub> 是碱性, 极性或非极性氨基酸, 例如, 碱性氨基酸, 如组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $p$ -氨基苯丙氨酸, 和 2, 4-二氨基丁酸, 或极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸;

Xaa<sub>17</sub> 是碱性, 极性, 脂族, 非极性或酸性氨基酸, 例如, 碱性氨基酸, 如组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $p$ -氨基苯丙氨酸, 和 2, 4-二氨基丁酸, 或极性氨基酸, 如天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 瓜氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 或高丝氨酸, 或脂族氨基酸, 如丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸, 或非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸, 酸性氨基酸, 如天门冬氨酸或谷氨酸;

Xaa<sub>18</sub> 是非极性或脂族氨基酸, 例如, 非极性氨基酸, 如甲硫氨酸, 甘氨酸或脯氨酸, 或脂族氨基酸, 如丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸;

Xaa<sub>19</sub> 是碱性或脂族氨基酸, 例如, 碱性氨基酸, 如, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 鸟氨酸, 高精氨酸,  $p$ -氨基苯丙氨酸

酸, 和 2,4-二氨基丁酸, 或脂族氨基酸, 如丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 叔-丁基丙氨酸, 叔-丁基丙氨酸, N-甲基异亮氨酸, 正亮氨酸, N-甲基缬氨酸, 环己基丙氨酸,  $\beta$ -丙氨酸, N-甲基甘氨酸, 或  $\alpha$ -氨基异丁酸;

5 在某些实施方案中:

Xaa<sub>1</sub> 是脯氨酸,

Xaa<sub>2</sub> 是精氨酸,

Xaa<sub>3</sub> 是半胱氨酸,

Xaa<sub>4</sub> 是甘氨酸,

10 Xaa<sub>5</sub> 是缬氨酸或天门冬酰胺,

Xaa<sub>6</sub> 是脯氨酸,

Xaa<sub>7</sub> 是天门冬氨酸,

Xaa<sub>8</sub> 是缬氨酸, 亮氨酸或丝氨酸,

Xaa<sub>9</sub> 是丙氨酸, 甘氨酸或组氨酸,

15 Xaa<sub>10</sub> 是天门冬酰胺, 天门冬氨酸, 组氨酸, 精氨酸, 谷氨酸酰胺或甘氨酸,

Xaa<sub>11</sub> 是酪氨酸或苯丙氨酸,

Xaa<sub>12</sub> 是天门冬酰胺, 丝氨酸, 精氨酸, 谷氨酸酰胺, 缬氨酸, 或甲硫氨酸,

20 Xaa<sub>13</sub> 是苯丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 苏氨酸, 丝氨酸, 或谷氨酸,

Xaa<sub>14</sub> 是苯丙氨酸, 甲硫氨酸或苏氨酸,

Xaa<sub>15</sub> 是脯氨酸或谷氨酸,

Xaa<sub>16</sub> 是精氨酸, 天门冬酰胺或甘氨酸,

25 Xaa<sub>17</sub> 是赖氨酸, 苏氨酸, 丝氨酸, 异亮氨酸, 甲硫氨酸, 甘氨酸, 天门冬氨酸或天门冬酰胺,

Xaa<sub>18</sub> 是脯氨酸或亮氨酸,

Xaa<sub>19</sub> 是赖氨酸, 缬氨酸或精氨酸。

30 本发明理想的肽包括由 SEQ ID NO: 1-13 限定的序列。例如, 具有 SEQ ID NO: 11 的 19 个氨基酸的肽 (PRCGNPDVANYNFFPRKPK) 是理想的。该肽 (SEQ ID NO: 11) 跨越 MMP-2 的切割位点。两个较小的肽 (PRCGNPDVA (SEQ ID NO: 12)) 和 NYNFFPRKPK (SEQ ID NO: 13))

代表了 SEQ ID NO: 11 肽的一半，也是理想的肽。所有这三个肽都可抑制 MMP-9 的活性并抑制其它基质金属蛋白酶至不同的程度。

所含序列与基质金属蛋白酶切割区的序列相同的单一肽可用于抑制单个或仅仅几个基质金属蛋白酶的活性。这种单一肽的制剂可抑制一个或多个，但不是全部的基质金属蛋白酶。基质金属蛋白酶活性的这种部分抑制促进愈合。可选择性地，可把两个或多个肽组合，从而针对两个或多个基质金属蛋白酶，提供对基质金属蛋白酶活性的更完全抑制。

本领域的技术人员可利用现有的教导和这里提供的教导，设计一种适宜的肽抑制剂或肽抑制剂的组合，从而获得所需的抑制质量和数量。抑制“质量”是指所抑制基质金属蛋白酶的类型。不同的基质金属蛋白酶可具有多少不同的底物及活性位点。抑制的“数量”是指抑制所有基质金属蛋白酶的总体量。通过调节所用肽抑制剂的类型和量，可调节抑制的质量和数量。本领域的技术人员可很容易地对本发明提供的肽进行修饰，并观察被抑制的基质金属蛋白酶的类型和程度。

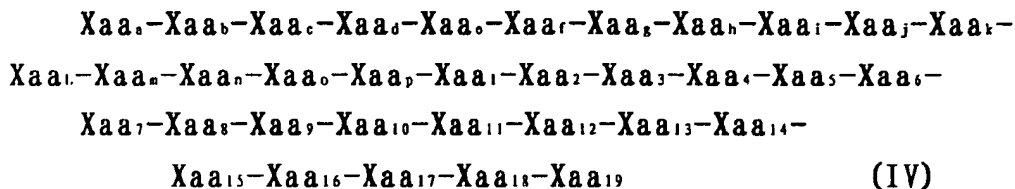
例如，本领域的技术人员可对图 1 所示的肽序列进行比较和比对，并设计出一种肽抑制剂，从而获得所需的抑制质量和数量。在其中一个实施方案中，通过实施例提供了对三处创伤位点的基质金属蛋白酶，mmp2, mmp9 和 mmp1 的比对的氨基酸序列进行的比较，从而鉴定序列中的同源区和趋异区。

<u>MMP</u>	<u>序列</u>	<u>SEQ ID NO</u>
mmp2:	<u>MQKFFGLPQTGDLDQNTIETMRKPRCGNPDVANYNFFPRKPKW</u>	NO:15
mmp9:	<u>LQKQLSLPETGELDSATLKAMRTPRCGVDPDLGRFQTFEGDLKW</u>	NO:16
mmp1:	<u>MQEFFGLKVTGKPD<del>AE</del>TLKVMKQPRCGVPDVAQFVLTEGNPRW</u>	NO:17

在该序列比对中，粗体表示在 MMP-1 中找到，但在 MMP-2 或 MMP-9 中没有找到的氨基酸，下划线表示在 MMP-1 中找到，并仅在 MMP-2 或 MMP-9 中找到的氨基酸。

在其中一个实施方案中，希望能够抑制 MMP-2 和 9，但保持 MMP-1 的水平相对不被调节，从而使慢性创伤愈合。根据上述序列比对，本领域的技术人员可设计出一种肽，该肽的氨基酸可在 MMP2 和 MMP9 的酶原序列中找到，但没有在 MMP1 的酶原序列中找到，从而产生一种抑

制 MMP-2 和 9, 但使 MMP-1 不受抑制的肽。这种肽由式 IV 提供。



(SEQ ID NO: 18)

其中:

- |    |                                      |  |
|----|--------------------------------------|--|
|    | Xaa <sub>a</sub> 是脯氨酸;               | Xaa <sub>1</sub> 是脯氨酸;                 |
|    | Xaa <sub>b</sub> 是谷氨酰胺或谷氨酸;          | Xaa <sub>2</sub> 是精氨酸;                 |
| 10 | Xaa <sub>c</sub> 是苏氨酸;               | Xaa <sub>3</sub> 是半胱氨酸;                |
|    | Xaa <sub>d</sub> 是甘氨酸;               | Xaa <sub>4</sub> 是甘氨酸;                 |
|    | Xaa <sub>e</sub> 是天门冬氨酸或谷氨酸;         | Xaa <sub>5</sub> 是缬氨酸或天门冬酰胺, 理想是天门冬酰胺; |
|    | Xaa <sub>f</sub> 是亮氨酸;               | Xaa <sub>6</sub> 是脯氨酸;                 |
| 15 | Xaa <sub>g</sub> 是天门冬氨酸;             | Xaa <sub>7</sub> 是天门冬氨酸;               |
|    | Xaa <sub>h</sub> 是谷氨酰胺或丝氨酸;          | Xaa <sub>8</sub> 是缬氨酸或亮氨酸, 理想是亮氨酸;     |
|    | Xaa <sub>i</sub> 是天门冬酰胺或丙氨酸;         | Xaa <sub>9</sub> 是丙氨酸或甘氨酸, 理想是甘氨酸;     |
| 20 | Xaa <sub>j</sub> 是苏氨酸;               | Xaa <sub>10</sub> 是天门冬酰胺或精氨酸;          |
|    | Xaa <sub>k</sub> 是异亮氨酸或亮氨酸, 理想是异亮氨酸; | Xaa <sub>11</sub> 是酪氨酸或苯丙氨酸, 理想是酪氨酸;   |
|    | Xaa <sub>l</sub> 是谷氨酸或赖氨酸, 理想是谷氨酸;   | Xaa <sub>12</sub> 是天门冬酰胺或谷氨酰胺;         |
| 25 | Xaa <sub>13</sub> 是苯丙氨酸或苏氨酸;         | Xaa <sub>14</sub> 是苯丙氨酸;               |
|    | Xaa <sub>m</sub> 是苏氨酸或丙氨酸;           | Xaa <sub>15</sub> 是脯氨酸或谷氨酸, 理想是脯氨酸;    |
|    | Xaa <sub>n</sub> 是甲硫氨酸;              | Xaa <sub>16</sub> 是精氨酸或甘氨酸, 理想是精氨酸;    |
| 30 | Xaa <sub>o</sub> 是精氨酸;               | Xaa <sub>17</sub> 是赖氨酸或天门冬氨酸;          |
|    | Xaa <sub>p</sub> 是赖氨酸或苏氨酸;           |  |

Xaa<sub>18</sub>是脯氨酸或亮氨酸，理想是亮氨酸；并且  
Xaa<sub>19</sub>是赖氨酸。

### 肽的修饰

- 5 本发明还考虑对肽抑制剂进行修饰，从而使它们稳定，促进它们的摄取和吸收，改善本领域技术人员已知的，肽的任何其它特性和性质。例如，可将肽抑制剂环化，中和肽抑制剂的电荷，还可将肽抑制剂与其它化学部分连接。

利用本领域技术人员可获得的任何方法将肽环化。例如，通过已知的过程使N-末端和C-末端稠合形成肽键。还可将存在于肽中氨基酸侧链上的官能团连接，从而使本发明的肽环化。例如，可形成共价键的官能团包括--COOH和--OH；--COOH和-NH<sub>2</sub>；和--COOH和--SH。可用于使肽环化的氨基酸对包括Asp和Lys；Glu和Lys；Asp和Arg；Glu和Arg；Asp和Ser；Glu和Ser；Asp和Thr；Glu和Thr；Asp和Cys；及Glu和Cys。能够彼此形成共价键的氨基酸残基的其它例子包括半胱氨酸样氨基酸，如Cys，hCys，β-甲基-Cys和Pen，它们可彼此形成二硫键。理想的半胱氨酸样氨基酸残基包括Cys和Pen。可用于使肽环化的其它氨基酸对是本领域那些技术人员显而易见的。

用于使肽环化的基团不一定是氨基酸。能够与肽氨基末端形成共价键的官能团的例子包括羧酸和酯。能够与肽羧基末端形成共价键的官能团的例子包括--OH，--SH，--NH<sub>2</sub>和--NHR，其中R是(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基，(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烯基和(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)炔基。

适于在带有官能团的两个侧链之间形成这种键的反应种类，以及适于形成这种连接的反应条件，对于本领域那些技术人员而言是显而易见的。用于使肽环化的理想反应条件要足够温和，这样才不致使肽降解或对肽造成损害。用于保护各种官能度所必需的适宜基团是本领域技术人员熟知的（见，例如，Greene & Wuts, 1991, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, NY），用于制备这种保护性分子的各反应流程也是本领域技术人员熟知的。

30 在其中一个实施方案中，将N-末端和C-末端的电荷有效除去。这一点可由本领域技术人员通过任何可获得的方法进行，例如，使N-末端乙酰化，并使C-末端酰胺化。

制备环状肽和以其它方式对肽进行修饰的方法是本领域熟知的(见,例如, Spatola, 1983, Vega Data 1(3), 一般性综述); Spatola, 1983, “肽主链的修饰”: Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins (Weinstein ed.), Marcel Dekker, New York, p.267 (一般性综述); Morley, 1980, Trends Pharm.Sci.1:463-468; Hudson 等, 1979, Int.J.Prot.Res.14:177-185 (—CH<sub>2</sub>NH—, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—); Spatola 等, 1986, Life Sci. 38:1243-1249 (—CH<sub>2</sub>—S); Hann, 1982, J.Chem.Soc.Perkin Trans.I. 1:307-314 (—CH=CH—, 顺式和反式); Almquist 等, 1980, J.Med.Chem.23:1392-1398 (—COCH<sub>2</sub>—); Jennings-White 等, Tetrahedron. Lett. 23:2533 (—COCH<sub>2</sub>—); 欧洲专利申请 EP 45665 (1982) CA:97:39405 (—CH(OH)CH<sub>2</sub>—); Holladay 等, 1983, Tetrahedron Lett. 24:4401-4404 (—C(OH)CH<sub>2</sub>—); 和 Hruby, 1982, Life Sci. 31:189-199 (—CH<sub>2</sub>—S—).

#### 15 抗血管发生和创伤愈合用途

根据本发明, 此处提供的肽可用于使创伤愈合并且用作抗血管发生剂。作为抗血管发生剂, 该肽可以用于治疗涉及不适当血管发生的任何疾病。例如, 涉及不适当血管发生的疾病包括癌症、肿瘤、某些眼病等。此处使用的术语“癌症或肿瘤”是指任何赘生性疾病, 包括癌、肉瘤和癌-肉瘤。癌症和肿瘤可以是转移性的, 非转移性的、血管化的、硬的或软的。

特定类型的癌症包括, 但不限于, 神经胶质瘤、神经胶质肉瘤、退行性星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、脊索瘤、咽喉癌、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、睾丸肿瘤、肾母细胞瘤、尤因瘤、膀胱癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉瘤、乳头肉瘤、乳头腺肉瘤、囊腺肉瘤、支气管肺癌、髓样癌、肥大细胞瘤、间皮瘤、滑膜瘤、黑色素瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、寡突胶质细胞瘤、听神经瘤、成血管细胞瘤、脑膜瘤、松果体瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、上皮癌、胚胎癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、纤维肉瘤、粘液瘤、粘液肉

瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、白血病和这些原发肿瘤继发的转移性病变。概言之，可以根据本发明治疗任何赘生性病变，包括肉芽肿。因此，本发明中的术语“癌症”也包括支持肿瘤血管发生等功能的癌症，以及肿瘤内皮细胞。

- 5 本发明的肽也可以用于治疗以过多的血管发生为特征的疾病。血管发生介导的疾病的一个例子是眼部新血管疾病。该疾病的特征在于新血管侵入眼部结构，如视网膜或角膜。在年龄相关的黄斑变性中，相关的视觉问题是由于脉络膜毛细血管向内生长通过 Bruch 膜的缺陷，纤维血管组织在视网膜色素上皮增殖。血管发生损害也与糖尿病视网膜炎、早发性视网膜炎、角膜移植物排斥、新血管性青光眼和晶体后纤维组织增生相关。其它与角膜新血管化相关的疾病包括，但  
10 不限于流行性角结膜炎、维生素 A 缺乏、隐形眼镜佩戴过度、特应性角膜炎、上缘 (superior limbic) 角膜炎、干燥性翼状胬肉角膜炎 (pterygium keratitis sicca)、干燥综合征、红斑痤疮、  
15 phlyctenulosis、梅毒、分支杆菌感染、脂变性、化学灼伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯疱疹感染、带状疱疹感染、原生动物感染、卡波西肉瘤、莫伦溃疡、Terrien 边缘变性、边缘角质层分离、类风湿性关节炎、系统性狼疮、多动脉炎、创伤、Wegener 结节病、巩膜炎、Steven's Johnson 病、类天疱疮、放射状角膜切开术和角膜移植物排斥。  
20

- 与视网膜/脉络膜的新血管化相关的疾病包括，但不限于，糖尿病视网膜炎、黄斑变性、镰状细胞贫血、结节病、梅毒、弹性膜假黄瘤、佩吉特病、静脉阻塞、动脉阻塞、颈动脉阻塞性疾病、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎、分支杆菌感染、莱姆病、系统性红斑狼疮、早发性视网膜炎、伊尔斯病、贝切特病、导致视网膜炎或脉络膜炎的感染、推定的眼部组织胞浆菌病、贝斯特病、近视、视凹陷 (optic pits)、斯塔加特病、pars planitis、慢性视网膜脱落、高粘度综合征、弓形体病、创伤和激光治疗后并发症。其它疾病包括，但不限于，与潮红（角新血管化）相关的疾病以及纤维血管或纤维组织异常增殖导致的疾病，  
25  
30 包括所有形式的增殖性玻璃体视网膜炎。

在黄斑变性中，黄斑（视网膜的一部分，负责最敏锐的视觉）下的进展性脉络膜血管发生干扰视觉。在糖尿病视网膜中，视网膜中的

血管发生干扰视觉。尽管目前还不了解起始黄斑变性和糖尿病视网膜  
病中的血管生长的初始刺激, VEGF 似乎是关键的血管发生诱导剂  
(Lopez, P. F. et al. (1996) Invest. Ophthalmol. Visual Science  
37, 855-868; Kliffen, M. et al. (1997) Br. J. Ophthalmol.  
5 81, 154-162; Kvant, A. et al. (1996) Invest. Ophthalmol. Visual  
Science 37, 1929-1934; Paques et al. (1997) Diabetes &  
Metabolism 23: 125-130)。作为 VEGF 表达的抑制剂, 本发明的肽抑  
制剂因此可以用于减少黄斑变性和其它疾病中的血管发生。

涉及血管发生的另一种疾病被认为是类风湿性关节炎。关节的滑  
10 膜覆盖物中的血管进行血管发生。除形成新血管网外, 内皮细胞释放  
导致血管翳生长和软骨破坏的因子和反应性氧。参与血管发生的因子  
可以主动有助于, 并且帮助维持类风湿性关节炎的慢性炎症状态。

因此, 本发明的肽可以用于抑制肿瘤生长和发展, 从而治疗眼病  
和愈合慢性创伤。各个肽, 肽变体, 肽衍生物及具有不同序列的肽混  
15 合物都可在制剂中组合, 从而促进创伤愈合, 抑制血管发生和/或防止  
肿瘤生长和/或发展。最理想的愈合、血管发生抑制和肿瘤抑制可能需  
要某些基质金属蛋白酶活性。因此, 本发明的组合物及制剂无需促进  
基质金属蛋白酶的最大抑制。相反, 可根据需要改变肽抑制剂制剂的  
20 活性, 从而使愈合情况达到最佳, 并且抑制血管发生或肿瘤生长和发  
展。通过改变肽抑制剂的类型, 内含物及量可获得更低或更高水平的  
抑制, 从而抑制血管发生并且促进愈合和肿瘤破坏。

为了抑制肿瘤发展和血管发生, 促进肿瘤破坏, 治疗眼病和帮助  
创伤愈合, 可按照本领域技术人员选择的任何方式将本发明的肽给予  
哺乳动物。例如, 可把肽配制成治疗组合物, 该治疗组合物含有治疗  
25 有效量的一种或多种肽及药学上可接受的载体。这种组合物可以口  
服、肠胃外或局部给药。可以制备所述肽的可注射溶液或悬浮液。可  
以使用可口服给药或可以植入肿瘤或创伤位点的持续释放制剂。可在  
植入常规位点中的药物递送装置中给予肽, 所述位点例如, 肿瘤附  
近或被认为是癌症性的或容易形成癌症或肿瘤的器官。组合物可以作  
30 为乳膏, 喷雾剂, 泡沫状物, 凝胶或任何其它制剂形式而被引入到皮  
肤上或眼中或创伤中。

在另一实施方案中, 本发明的肽可被配制成皮肤遮盖物或敷料,



其中含有浸渗到治疗装置、药物递送装置、皮肤遮盖物或敷料中，与治疗装置、药物递送装置、皮肤遮盖物或敷料共价连接或以其它方式缔合的治疗有效量的一种或多种肽。在其中一个实施方案中，所述药物递送装置、皮肤遮盖物或敷料可释放肽抑制剂。肽抑制剂的释放可以不受控制或受控制的方式进行。因此，本发明的药物递送装置、皮肤遮盖物或创伤敷料可将肽抑制剂缓慢或计时释放到组织中。皮肤遮盖物和敷料可以是本领域使用的任何材料，包括绷带，纱布，无菌包扎材料，水凝胶，水胶体以及类似材料。

在一种实施方案中，治疗有效量的本发明肽是指肽的量可抑制基质金属蛋白酶至促进健康皮肤发育和/或创伤愈合所需的程度。在另一种实施方案中，治疗有效量的本发明肽是指肽的量可抑制 VEGF 表达。VEGF 表达的抑制程度可以不同。在一些实施方案中，VEGF 表达的抑制程度足以抑制血管发生或显著血管化的发展或显著的血管形成。

例如，存在于治疗或药物组合物中的本发明肽的量占组合物重量的约 0.001%-约 75%。例如，所述肽可占组合物重量的约 0.5%-约 60%。可选择性地，所述肽可占组合物重量的约 1.0%-约 50%。

肽抑制剂的治疗有效量可随给药途径而改变。例如，30-112,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重的治疗量对于静脉内给药是有效的。然而，用于健康皮肤发育或创伤治疗所需的肽抑制剂的量不仅随给药途径而改变，而且还根据所治疗疾病的性质以及患者的年龄和健康状况而改变，并最终由主治医师或临床医师决定。

给药剂量和方法视所治疗皮肤或组织的位置和/或创伤的严重程度而定。肽以及肽偶联物的有效剂量可由它们相关的体外活性，以及在这里所述的动物模型中的体内活性而定。所述化合物可以单位剂型给药；例如，每个单位剂型含有约 0.001  $\mu\text{g}$ -约 10mg，优选约 0.01  $\mu\text{g}$ -约 5mg，更优选约 0.10  $\mu\text{g}$ -约 1mg，甚至更优选约 1.0  $\mu\text{g}$ -500  $\mu\text{g}$  的肽。所需剂量可以单一剂量，分割剂量，或连续输注给出。所需剂量还可间隔适当的时间给药，例如，每天两次，三次，四次或更多个亚剂量给药。本领域的技术人员可使用这里提供的教导，根据所得到的信息，很容易地制备并给予有效制剂。

本发明的肽抑制剂可配制成药物组合物，并以适合所选给药途径，即，口服或肠胃外，静脉内，肌内，局部或皮下途径的不同剂量

形式给予哺乳动物宿主，如人类患者。

因此，所述肽抑制剂可以全身给药，例如，通过输注或注射静脉内或腹膜内给药。肽抑制剂的溶液可在水中制备，任选与无毒的表面活性剂混合。也可在甘油，液态聚乙二醇，三乙酸甘油酯及其混合物和油中制备分散液。在普通的贮藏和使用条件下，这些制剂含有防止微生物生长的防腐剂。

适于注射或输注或局部涂抹的药物剂型包括含有活性成分的无菌水溶液或分散液或无菌粉末，其中所述活性成分适于无菌可注射或可输注的溶液或分散液的临时制备，任选地，所述活性成分还可包在脂质体中。在所有情况下，最终的剂型在制备和贮藏条件下必须是无菌，可流动且稳定的。液态载体或赋形剂可以是含有，例如，水，乙醇，多元醇（丙三醇，丙二醇，液态聚乙二醇等），植物油，无毒甘油酯，及其适宜混合物的溶剂或液态分散介质。适当的流动性可通过形成脂质体，维持分散液的必须粒径，或使用表面活性剂而维持。通过使用各种抗细菌剂或抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯，氯丁醇，苯酚，山梨酸，硫汞撒等可防止微生物的作用。在某些情况下，本领域的技术人员可选择使用等渗剂，例如，糖，缓冲液或氯化钠。在组合物中使用延迟吸收剂，例如，一硬脂酸铝和明胶，可延长可注射组合物的吸收。

无菌可注射溶液是通过把所需量的肽或肽偶联物掺入含有上面所列各种其它成分的溶剂中而制备的，如果需要还可进行过滤灭菌。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末情况下，制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术，从而产生含有活性成分以及存在于先前无菌过滤溶液中的任何其它所需成分的粉末。

在某些情况下，肽抑制剂还可与药学上可接受的赋形剂，如惰性稀释剂或可同化的食用载体联合口服给药。还可把它们装入硬壳或软壳的明胶胶囊中，还可把它们压制成片剂，或直接掺入患者的饮食。对于口服治疗给药而言，肽抑制剂可与一种或多种赋形剂组合，并以可摄取的片剂，颊片，锭剂，胶囊剂，酏剂，混悬液，糖浆剂，薄膜片等形式使用。这种组合物和制剂可以含有至少 0.1% 的活性化合物。当然，组合物和制剂的百分比可发生改变，占已知单位剂型重量的约 2%-约 75%。这种治疗有效组合物中的活性化合物的量可获得有效的剂

量水平。

片剂，锭剂，丸剂，胶囊剂等还可含有下列成分：粘合剂，如黄  
芪胶，阿拉伯胶，玉米淀粉或明胶；赋形剂，如磷酸二钙；崩解剂，  
如玉米淀粉，马铃薯淀粉，海藻酸等；润滑剂，如硬脂酸镁；和甜味  
5 剂，如蔗糖，果糖，乳糖或天冬甜素；或调味剂，如薄荷，冬青油或  
樱桃味的调味剂。当单位剂型为胶囊剂时，除了上述类型的材料之外，  
它还可含有液态载体，如植物油或聚乙二醇。各种其它物质还可作为  
包衣存在，或改变固态单位剂型的物理形式。例如，片剂，丸剂或胶  
囊剂可用明胶，蜡，虫胶或糖等包衣。糖浆剂或酏剂可含有活性化合  
10 物，作为甜味剂的蔗糖或果糖，作为防腐剂的甲基和丙基对羟基苯甲  
酸酯，染料和调味剂，如樱桃味或橙味的调味剂。当然，制备任何单  
位剂型所用的任何材料都应当是药理学上可接受的，而且所用的量应基  
本无毒。此外，还可把肽抑制剂掺入到持续释放制剂和装置中。

有用的固态载体包括精细分割的固体，如滑石粉，粘土，微晶纤  
15 维素，二氧化硅，氧化铝等。有用的液态载体包括水，醇或二醇或水-  
醇/二醇混合物，其中可将存在的化合物以有效水平溶解或分散在其  
中，任选地，还可借助于无毒的表面活性剂。此外，还可加入佐剂，  
如香料和其它抗菌剂，从而优化已知用途的性质。

增稠剂，如合成聚合物，脂肪酸，脂肪酸盐和酯，脂肪醇，改性  
20 纤维素或改性矿物质也可与液态载体一起使用，从而形成容易涂抹的  
糊剂，凝胶，软膏剂，肥皂等，用于直接涂抹在使用者的皮肤上。

通常，可局部给予本发明的肽，用于创伤的治疗并促进健康皮肤  
的发育。活性肽可以任何方式局部给药，例如以喷雾剂，泡沫状物，  
粉剂，乳膏剂，胶冻，糊剂，栓剂或溶液直接或间接给予所选择的组  
25 织。本文件中使用的术语“糊剂”包括乳膏剂和其它粘性、容易涂抹  
的组合物，例如常常直接涂在皮肤上或摊在绷带或敷料上的组合物。  
本发明的肽还可与皮肤遮盖物或创伤敷料共价连接，稳定吸附或以其  
它方式涂在皮肤遮盖物或创伤敷料上。为了促进手术后的愈合，可把  
本发明的活性肽直接涂在目标组织或假体装置或可植入的持续释放装  
30 置上。所述组合物还可利用气溶胶，作为泡沫状物或烟雾给药，其中  
可有或没有其它药剂，直接涂在皮肤或创伤处。

所述肽可以制剂的形式给药，该制剂包括肽在蜡，油，乳化剂，

水,和/或在水存在下形成凝胶、又基本上不溶于水的物质中的乳状液。该制剂可提供理想的乳状液性质,它易于分散,并具有乳状液的乳脂状稠度,当经历标准灭菌过程,例如,蒸汽灭菌时不会分解,这是因为凝胶可使乳状液稳定。它还显示出与传统凝胶相比,更好的水保留性,这是因为水同时保存在乳状液和凝胶中。

该制剂还可含有湿润剂,从而减少乳膏或洗液中水的部分蒸汽压,降低乳膏或洗液干燥的速度。适宜的湿润剂可与水很大程度地混溶,通常适于涂在皮肤上。多元醇尤其适于这个目的,适宜的多元醇可包括一丙二醇或丙三醇(甘油)。多元醇可占总制剂(重量)的20-50%;优选30-40%。相对较高比例的多元醇可确保在糊剂干燥至任何程度时,最终的糊剂仍然保持柔软并可塑,这是因为甘油可作为聚合物的增塑剂起作用。当把糊剂涂在绷带上时,例如,可很容易地把它从皮肤上除去,当糊剂失去水份时,无需撕下绷带。当与皮肤或创伤,特别是感染的创伤接触时,多元醇还具有防止糊剂中的细菌增殖的作用。

所述制剂可含有其它成分。可用的成分包括:氧化锌,鱼石脂,炉甘石, silver suphadiazine, 醋酸洗必太, 煤焦油, 葡萄糖酸洗必太, 水杨酸, 甲硝唑或其它抗菌剂, 或其组合。另外还可找到适于掺入到乳膏中的其它成分。

这些成分可以有利的量加入,例如,可加入多至约15重量%的氧化锌;通常使用6-10%的氧化锌,还可与其它成分,如鱼石脂(0-3重量%)和/或炉甘石(0-15重量%)混合。鱼石脂或炉甘石也可单独使用。醋酸洗必太的使用浓度为1重量%;通常为0.5重量%。

乳状液蜡的例子是甘油一硬脂酸酯,或甘油一硬脂酸酯与PEG100硬脂酸酯的组合,PEG100硬脂酸酯是作为CITHROLGMS/AS/NA从Croda Universal Ltd.获得的。这种组合可同时提供蜡和乳化剂(PEG100硬脂酸酯),所述乳化剂尤其可与蜡相容,用于在水中形成乳状液。制剂中还可含有第二种乳化剂,从而增加乳状液的稳定性,例如,PEG20硬脂酸酯,如Croda Universal Ltd.提供的CITHROL 10MS。乳膏中的乳化剂总浓度通常应为3-15%。当使用两种乳化剂时,其中一种的浓度可能比另外一种要高。

水不溶性物质可与制剂中的水形成凝胶。因此该物质是亲水的,

但不能在水中溶解至任何较大的程度。所述物质可以是聚合物，吸水的水不溶性聚合物。然而，也可使用与水形成凝胶并在较高温度下稳定的非聚合物，例如，粘土，如高龄土或膨润土。用于本发明中的某些聚合物是超级-吸收性的聚合物，如在 W0-92/16245 中公开的那些，  
5 它们含有已经部分交联，从而形成三维结构的亲水性纤维素衍生物。适宜 5 的交联纤维素衍生物包括羟低级烷基纤维素的那些，其中所述烷基含有 1-6 个碳原子，例如，羟乙基纤维素或羟丙基纤维素，或羧基纤维素，例如，羧甲基羟乙基纤维素或羧甲基纤维素。本发明所用聚合物的例子是 Akzo Chemicals B.V. 作为 AKUCCELL X181 提供的部分  
10 交联的羧甲基纤维素钠聚合物。这种聚合物是超级吸收性聚合物，它可吸收至少为自身重量 10 倍的水。聚合物的交联结构可防止它在水中溶解，但水又很容易吸收到其中，并在聚合物的三维结构内保持，形成凝胶。水从这种凝胶损耗的速度要比从溶液损耗的速度慢，这对于减缓或防止乳膏制剂干燥十分有利。制剂的聚合物含量通常低于 10%，  
15 例如，聚合物含量可占重量的约 0.5-约 5.0%，或占重量的约 1.0%-2%。

所述制剂可以是灭菌的，此外应当对制剂的成分进行选择，通过改变聚合物含量而提供具有所需流动性的终产物。也就是说，如果产物是灭菌的，那么应当在灭菌前对制剂进行选择，从而提供粘度/弹性相对较高的产物。如果没有对制剂的某些成分进行灭菌，那么可在加入  
20 那些成分之前对制剂灭菌，或将每个成分单独灭菌。所述制剂还可通过在无菌条件下，将分别灭菌的成分混合而制备。当对各成分单独灭菌，然后混合在一起时，可调节聚合物的含量，从而产生具有所需流动性的终产物。乳状液的含量决定了加工性质和制剂的感觉，乳状液含量越高，就越容易涂抹，而且是乳脂状的。

25 此外，还可把制剂装到管，桶或其它适宜的贮存容器形式中，或把它涂在基质上，然后包装。适宜的基质包括敷料，如薄膜敷料，和绷带。

通过下列实施例进一步描述本发明，所述实施例是用于举例说明，而不是对所附权利要求限定的本发明范围的限制。

#### 30 实施例 1: 肽抑制剂

##### 通用材料

所有肽都是由 Sigma-Genosys, Inc. 合成的。由公司利用 RP-HPLC

把释放的肽纯化至均一性>95%。除去所收集的洗脱峰物质中的盐分，并将其冷冻干燥。质谱分析证实可证实肽的分子量和纯度。除非另有说明，所有化学品都是从 Sigma Chemical Corp. 或 Fluka Chemical Co 购买的。活性 MMP-9 酶是从 Calbiochem 购买的。

## 5 分子模型

分子模型利用了两个可视程序，Swiss PDB Viewer (Guex and Peitsch, 1997) 和 Rasmol (Sayle and Milner-White, 1995)。建立模型的工作是在 Compaq PC running Windows 95, 以及 Silicon Graphics, Inc. Octane UNIX 工作站上进行的。此外，在 Octane 上利用了 Molecular Simulations, Inc. 的 Cerius2 分子包。三维结构的文件是从蛋白质数据库下载的，(文件名，参考文献) 如下：MMP-1 (1FBL, Li 等, 1995), MMP-2 (1GEN, Libson 等, 1995), MMP-8 (1JAO, 1JAN, Grams 等, 1995; Reinemer 等, 1994), MMP-9 (1MMQ, Browner 等, 1995), TIMP-2/MT-1 MMP 复合物 (1BUV, Fernandez-Catalan 等, 1998), TIMP-2 (1BR9, Tuuttila 等, 1998), 和 TIMP-1/MMP 复合物 (1UEA, Gomis-Ruth 等, 1997; Huang 等, 1996; Becker 等, 1995)。这些文件用于分析蛋白的三维结构，而且是原始序列数据的来源。

## 抑制测定法

这里进行了两个酶测定法。第一个测定法测量作为时间的函数的 MMP-9 对荧光化胶原的酶水解。将 5 $\mu$ M 浓度的荧光化胶原 (Molecular Probes, Inc.) 加入到反应缓冲液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mM NaN<sub>3</sub>) 中，然后放在 Spectrosil 石英荧光计的比色杯中。将 0.1 $\mu$ M 浓度的 MMP 与不同量的肽混合，25 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟，从而引起结合。将蛋白混合物加入到胶原底物中，迅速混合。在 Shimadzu RF5301 荧光计中测量作为时间的函数 (激发波长 495nm) 的 520nm 处的荧光发射强度 (Lakowicz, 1983)。荧光素释放测定法可用于测定肽抑制剂 ([I]) 的抑制常数 (K<sub>i</sub>)，它是按照 Segel (1993) 利用 Dixon 图 (1/v vs. [I]) 获得的：

$$\text{斜率} = K_m / (V_{\max} K_i [S]) \quad (1)$$

其中，K<sub>m</sub> 是 Michaelis 常数，V<sub>max</sub> 是反应最大速率，[S] 是底物浓度。

第二个测定法利用了荧光共振能转移 (FRET) 技术。使 7 个氨基

酸的底物肽 (Calbiochem) 与羧基末端的二硝基苯受体, 和氨基末端的 2-氨基苯并氨基萘 (Abz) 部分供体偶联。利用 MMP-9 切割该底物, 释放出荧光产物 (365nm 激发, 450nm 发射)。将 5 $\mu$ M 浓度的肽加入到反应缓冲液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mM NaN<sub>3</sub>) 中, 并放在先前已经用 1% BSA 封闭的黑色 96-孔微量滴定平板的孔中。将 0.1 $\mu$ M 浓度的 MMP 与不同浓度的 9 聚体 (SEQ ID NO:12), 10 聚体 (SEQ ID NO:13), 或 19 聚体 (SEQ ID NO:11) 肽混合, 25 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟, 从而引起结合。将蛋白混合物加入到荧光肽底物中, 迅速混合。用 Dynex MFX 荧光微量滴定平板阅读器测量作为时间的函数的荧光强度。通过使用含非-FRET 肽的 Abz 产生的标准曲线可知, 荧光强度与切割的肽摩尔数有关。抑制常数就是从该曲线得到的。其它基质金属蛋白酶是以类似方法, 利用特异性的底物 FRET 肽 (全部来源于 Calbiochem) 测试的。

#### 抗活化测定法

该测定法用于测量有多少酶原转化为成熟的基质金属蛋白酶。将酶原 MMP-9 酶原 (100 $\mu$ g) 与 0.5 $\mu$ g 基质溶素在 PBS 中混合。35 $^{\circ}$ C 温育该反应物。80 分钟后, 除去反应物中的等分试样。将各等分试样与 EDTA 混合至 1mM 的终浓度, 然后注射到 BioSelect 125 HPLC 柱上, 在 PBS 中进行层析。0 (注射) 时间点是一个单峰, 它是在大约 750 秒时从柱子上洗脱下来的。该峰的大小随时间而降低, 并出现了两个新的峰。第一个峰是在大约 800 秒时洗脱下来的, 代表 MMP-9 的成熟形式。第二个峰是在大约 1100 秒时洗脱下来的, 与 N-末端的酶原结构域片段相对应。峰面积是通过求洗脱曲线的积分而测定的, 并绘制了面积改变的百分比图。

#### 等温滴定量热法

等温滴定量热法 (ITC) 是用 MicroCal, Inc. 的 VP-ITC 仪器进行的。滴定是通过将 5 $\mu$ L 抑制剂肽溶液 (浓度为 0.5mM-2.0mM) 注射到 1.4mL 搅拌的反应细胞中进行的。细胞中 MMP-9 的浓度为 50-80 $\mu$ M。抑制剂和酶存在于 20mM 二甲胍酸钠 (pH5.5-7.0), 40mM NaCl, 或 20mM Tris-HCl (pH7.0-7.5), 40mM NaCl 中。滴定是在 20 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C 进行的。进行滴定的典型实验条件为 10 秒的注射周期, 在总共 40 次的注射之间有 240 秒的延迟。将抑制剂肽空白滴定到缓冲液中, 从而校正稀释

和混合的热量。

对于结合实验评估而言，多个结合位点的独立设置是最常见的模型。分析溶液的总热量是通过下列公式 (Freire 等, 1990) 测定的:

$$Q = V \Delta H \times \left[ [L] + \frac{1 + [M] nK - \sqrt{(1 + [M] nK - [L]K)^2 + 4K[L]}}{2K} \right] \quad (2)$$

- 5 其中  $Q$  是总热量,  $V$  是细胞体积,  $\Delta H$  是焓,  $M$  是大分子 (细胞中的结合配偶体) 浓度,  $n$  是结合化学计量,  $L$  是配体 (注射器中的结合配偶体) 浓度,  $K$  是缔合常数。利用 Origin 版本 5 (MicroCal, Inc.) 使数据拟合于该模型。

表面等离子共振

- 10 利用 BiaCore-X 表面等离子共振 (SPR) 装置 (BiaCore, Inc.) 测量 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽 (P) 与 MMP-9 之间的相互作用。在这些实验中, 羧甲基葡聚糖传感器芯片 (CM-5, Lofas 等, 1993) 是用 50mM N-羟基琥珀酰亚胺, 0.2M N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺活化的, 流速为 10 $\mu$ L/分钟, 共进行了 10 分钟。使 75ng/ $\mu$ L 浓度的 MMP-9
- 15 以 10 $\mu$ L/分钟的流速与活化表面偶联 10 分钟。终表面是以 10 $\mu$ L/分钟的速率, 使 1M 乙醇胺-HCl 在传感器表面流动 5 分钟而灭活的。使浓度为 10-50nM 的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽以 20 $\mu$ L/分钟的速率在传感器表面流动。结合等温线的缔合与解离相是在模拟速率常数前, 利用自动化 FFT 程序校正的。通过使正向 ( $k_a$ ) 和反向 ( $k_d$ ) 速率常数同时配合评估结合等温线:

$$d[P-MMP-9]/dt = (k_a [P] [MMP-9]) - (k_d [P-MMP-9]) \quad (3)$$

(Karlsson 和 Falt, 1997), 其中  $[P]$ ,  $[MMP-9]$ , 和  $[P-MMP-9]$  分别为游离肽, 游离 MMP-9, 及复合物的浓度。平衡亲和力常数 ( $K_A$ ) 的定义如下:

$$25 \quad K_A = k_a / k_d \quad (4)$$

以 SPR 信号正确表达等式 3 为 (Morton 等, 1995):

$$dR/dt = k_a C R_{max} - (k_a C + k_d) R \quad (5)$$

- 其中  $R$  是  $t$  时间的 SPR 信号 (反应单位, RU),  $R_{max}$  是 RU 的最大 MMP-9 结合能力,  $C$  是螯合肽的浓度。动力学分析是使用 Microcal, Inc. 的 Origin 进行的 (O'Shannessy 等, 1993)。
- 30



### 存活力测定法

9 聚体 (SEQ ID NO: 12), 10 聚体 (SEQ ED NO: 13) 和 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的相对毒性是使用 MatTek Corp. 的皮肤模型 Epiderm 测定的。在加入肽之前, 将装有各皮肤样品的容器在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的培养基中预温育 2 小时。把含样品的容器转移到含有新鲜培养基的 6 孔平板中。将所有的肽都溶解在 PBS 中, 使其最终浓度达到 10mM, 然后将 100μl 各肽溶液吸移到 Epiderm 样品容器的表面上。在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下温育 12 小时。温育期后, 用 PBS 洗涤样品容器 3 次, 然后把含样品的容器转移到每个孔含有 300μL MTT (MTT 浓度为 1mg/mL) 测定培养基的 24 孔平板中。进行比色测定使显色进行 3 小时 (37℃, 5% CO<sub>2</sub> 温育)。然后把含样品的容器转移到每个孔含有 2mL 异丙醇的 24 孔培养平板中。室温提取有色沉淀物 4 小时。在 570nm 和 650nm 处阅读各样品的吸光度。然后按照下列公式计算各样品相对于 PBS 对照组的存活力百分比:

$$15 \quad 100 \times (OD_{570}^{sam} - OD_{650}^{sam}) / (OD_{570}^{con} - OD_{650}^{con}) \quad (6)$$

通常, 肽样品是一式三份测定的。

### 结果

基质金属蛋白酶-2 的序列 (SEQ ID NO: 14) 在下面提供, 从而帮助限定基质金属蛋白酶中的不同结构域和区。

```

1 MEALMARGAL TGPLRALCLL GCLLSHAAAA PSPIIKFPGD
41 VAPKTDKELA VQYLNTFYGC PKESCNLFVL KDTLKMKQKF
81 FGLPQTGDLD QNTIETMRKP RCGNPDVANY NFFPRKPKWD
121 KNQITYRIIG YTPDLDPETV DDAFARAFQV WSDVTPLRFS
161 RIHDGEADIM INFGRWEHGD GYPFDGKDGL LAHAFAPGTG
201 VGGDSHFDDD ELWTLGEGQV VRVKYGNADG EYCKFPFLFN
241 GKEYNSCTDT GRSDGFLWCS TTYNFEKDGK YGFCPHEALF
281 TMGGNAEGQP CKFPFRFQGT SYDSCTTEGR TDGYRWC GTT
321 EDYDRDKKYG FCPETAMSTV GGNSEGAPCV FPFTFLGNKY
361 ESCTSAGRSD GKMWCATTAN YDDDRKWGFC PDQGYSLFLV
401 AAHEFGHAMG LEHSQDPGAL MAPIYTYTKN FRLSQDDIKG
441 IQELYGASPD IDLGTGPTPT LGPVTPEICK QDIVFDGIAQ
481 IRGEIFFFKD RFIWRTVTPR DKPMGPLLVA TFWPELPEKI
521 DAVYEAPQEE KAVFFAGNEY WIYSASTLER GYPKPLTSLG
541 LPDPVQRVDA AFNWSKNKKT YIFAGDKFWR YNEVKKKMDP
601 GFPKLIADAW NAIPDNLDV VDLQGGGHSY FFKGAYYLKL
641 ENQSLKSVKF GSIKSDWLGC

```

9 个 MMP 氨基酸序列切割区的加强成对序列比对是使用 CLUSTAL™ (Higgins 等, 1992) 程序计算的。该比对限定了活化蛋白酶切割位点侧翼的保守及非保守氨基酸的位置。挑选活化切割位点的任意数量的 N-末端氨基酸和 C-末端氨基酸数进行比对。MMP 序列 (表 1) 的比对在图 1 中给出, 表明所有 MMP 活化区都可以统计学显著的方式进行比对。为了进行比对所选择的区大体上与氨基酸 70-120 相对应, 假定 MMP 结构的平均信号序列为氨基酸 1-20, 前肽结构域为氨基酸 21-100, 成熟活性酶则来源于氨基酸 101 到末端。为了进行研究而选择的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 序列包含在比对区内。具体而言, 在 MMP-2 中, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 与氨基酸 100-118 相对应。

MMP 序列的比对表明, 活化结构域的中心区 PRCGVPDV (SEQ ID NO: 1) 是高度保守的, 该区域侧翼有较大程度的序列变异。序列异质性可用于设计能够抑制特异性 MMP 酶, 或 MMP 组合的肽序列, 这一点是通过选择氨基酸 (以所述比对为基础) 进行的。此外, 改变特定肽的长度以调节效力。

MMP-1 酶原的三维结构在图 2 中提供, 表明表 1 和图 1 所示的活化区各自构成一个桥, 从而将两个大的球形结构域相互连接起来。切割

区被定义为一种短的非结构化的结构域，它将前肽结构域连接于活性酶结构域。作为活化步骤的一部分，该序列被切割为两半。它还是对 HgCl<sub>2</sub> 介导的体外活化敏感的区域。

活化可除去露出成熟酶活性位点的空间阻断（即，前肽的结构域）。N-末端接近催化锌离子，该离子通常是酶活性所需的。活性 MMP-9 的结构在图 3 中给出，锌离子以实心的球形表示。第二个锌离子是一种结构性离子，即，它有助于蛋白的稳定，但不能催化。19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的 C-末端部分现在成为酶的极端氨基末端，如图 3 左侧所示，作为最后一个环的上升部分（交叉线阴影部分）。从活化结构域肽到活化 MMP 的表面的模型化表明，该肽（特别是，如果包括较长的 N-末端区）可与活性位点区相互作用，实际上，阻断底物接近活性位点。以此方式，它可起到微型酶原结构域或酶的“帽”的作用。

已知酶可被蛋白水解成片段，这些片段进行重构，从而再生活性酶。各种肽结构域重新聚集，并被非共价分子间力结合在一起。这种肽-蛋白相互作用的典型例子包括核糖核酸酶 S-肽/核糖核酸酶 S-蛋白的相互作用 (Levit 和 Berger, 1976)。核糖核酸酶 S-肽在适当的位置与 S-蛋白结合，所得复合物恢复了 RNASE-S 的酶活性。

根据本发明，活化结构域肽可与区域中的活化 MMP 再次结合，其中它们存在于形成非活性复合物的 MMP 酶原中。这种结合是可以测量的（见下文）。此外，19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽可通过其半胱氨酸残基与锌离子配合，防止催化。

#### MMP 酶活性的抑制

第一项抑制研究是用来源于 MMP-2 切割结构域区的 19 氨基酸肽 (SEQ ID NO: 11) 进行的。该肽是从 CLUSTAL 序列比对区中选择的，证实了最高程度的保守。所选择的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 在 N-末端是严格保守的，但在 C-末端部分则显示出较高程度的变异性。此外，还对代表该肽 N-末端和 C-末端部分的两个较小的肽进行了试验。这两个部分大致把肽分成保守的 N-末端部分 (9 聚体 (SEQ ID NO: 12)) 和非保守的 C-末端部分 (10 聚体 (SEQ ID NO: 13))。这不仅可以测试抑制的总体有效性，而且还可以测试选择性。

19 聚体: PRCGNPDVANYNFFPRKPK (SEQ ID NO: 11)

9 聚体: PRCGNPDVA (SEQ ID NO: 12)

10 聚体: NYNFFPRKPK

(SEQ ID NO: 13)

在荧光测定法中, 所有这 3 个肽都能抑制 MMP-9。在所有研究情况下, 与两个一半的肽相比, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 是更好的酶抑制剂。9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 与 C-末端的 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 肽相比, 是更有效的抑制剂。这些结果表明, 半胱氨酸作为锌配体是必需的, 或者需要 N-末端区来影响酶活性位点的空间阻断。这个假设可通过生产含有更多 N-末端序列 (残基 100 之前的有效氨基酸) 的抑制剂肽而加以测试。使用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 滴定 MMP-9 的典型抑制图在图 4 中给出。

10 使用 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 和 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽进行的类似抑制分析分别在图 5 和 6 中表示。在 FRET 测定法中, 各肽都能够抑制 MMP-9, 抑制常数 ( $K_i$ ) 为 45.2-327.7 $\mu$ M (见表 4)。与三个肽的相对抑制相比, 底物选择 (FRET 肽或荧光胶原) 的差异较小, 但具有一致的趋势, 即: 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) > 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) > 10 聚体 (SEQ ID NO: 13)。用肽滴定 MMP-9 的典型反应图在图 7-9 中给出。

总的说来, 胶原底物的抑制常数稍低, 胶原为 30.3-221.3 $\mu$ M, FRET-肽为 45.2-327.7 $\mu$ M。这些数据表明, 当使用胶原底物时, 肽在一定程度上是更有效的抑制剂, 表明抑制剂肽可阻断活性位点, 且因为胶原明显比 FRET-肽底物更大, 因此更容易阻止它接近酶活性位点。较小的 FRET-肽底物可能更容易接近活性位点, 甚至是在抑制剂肽存在的情况下也是如此。

典型的酶测定 (如图 4-7 所示) 通常进行 30-40 分钟。延时测定显示, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 可有效抑制 MMP-9 催化的胶原水解直至超过 1000 分钟 (图 8)。与 9 聚体 (SEQ ID NO: 12) 肽相比, 10 聚体 (SEQ ID NO: 13) 肽在长时间阻止胶原破坏方面不是很有效 (图 9)。此外, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽显示出最大程度的抑制。

对其它 MMP 酶进行类似的酶研究, 从而测试 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的有效性。这些测定法使用的是 FRET 肽, 所述肽把特异性 MMP 切割位点插入到它们的序列中。19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽能够有效抑制多个 MMP。19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽对各 MMP 的有效性如下: MMP-2 > MMP-3 > MMP-8 > MMP-7 > MMP-9 > MMP-1, 抑制剂常数为 3.1 $\mu$ M (MMP-2) - 41.1 $\mu$ M (MMP-1)。这些数据在表 2 中总结。

表 4. 抑制剂数据的总结

肽	酶	底物	Ki ( $\mu$ M )
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-9	胶原	30.3
9 聚体 (SEQ ID NO: 12)	MMP-9	胶原	185.9
10 聚体 (SEQ ID NO: 13)	MMP-9	胶原	221.3
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-9	FPET 肽	45.2
9 聚体 (SEQ ID NO: 12)	MMP-9	FPET 肽	232.8
10 聚体 (SEQ ID NO: 13)	MMP-9	FPET 肽	327.7
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-1	FPET 肽	41.1
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-2	FPET 肽	3.1
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-3	FPET 肽	6.4
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-7	FPET 肽	22.8
19 聚体 (SEQ ID NO: 11)	MMP-8	FPET 肽	12.5

19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的抗剪接活性:

- 5 MMP 是以非活性酶原的形式生物合成产生的。利用各类膜结合 MMP 对酶原进行蛋白切割可导致 MMP 活化。酶原前导序列的长度大约为 100 个氨基酸 (根据 MMP 不同它也会改变), 而且它是在蛋白的最氨基末端被找到的。抑制酶原活化对于降低慢性创伤中的 MMP 酶活性而言, 可能是一种富有成效的方法。如果这些酶不能发挥作用, 那么 ECM 降
- 10 解的速率就会降低, 从而导致慢性创伤愈合的速度加快。

- 很明显, 活化结构域肽 (19 聚体 (SEQ ID NO: 11), 9 聚体 (SEQ ID NO: 12), 和 10 聚体 (SEQ ID NO: 13)) 可抑制各种 MMP 的酶活性。除这种活性之外, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽还可阻碍 MMP-9 的酶原 (非活性) 形式的活化。因此, 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽可通过抑制已经活
- 15 化的 MMP 或通过防止新合成的 MMP 酶原的活化而降低皮肤和慢性创伤渗出物内的总体 MMP 活性水平。

- 图 11 表示典型的剪接测定。在大约 700 秒时洗脱的第一个峰是 MMP-9 酶原。随着剪接反应的进行, 该峰的强度降低 (用向下的箭头标记), 并出现了两个新的峰。在大约 800 秒时洗脱下来的第一个新的峰
- 20 是成熟的活性 MMP-9。在大约 1050 秒时洗脱下来的第二个新的峰是酶

原结构域。随着剪接反应的进行，这两个峰的强度增加（用向上的箭头标记）。当反应完成时，没有检测到剩余的 MMP-9 酶原。使用 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽滴定标准剪接反应可防止 MMP-9 酶原转化成酶原结构域及活性酶。图 12 表示这次滴定的结果。剪接可使用微摩尔的 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽以剂量依赖性的方式抑制。

#### 等温滴定量热法

量热法可用于测定 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽是否能与活性 MMP-9 形成稳定的非-共价复合物。这些数据可用于进一步理解酶抑制的机理和 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的抗活化性。图 13 表示 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) MMP 抑制剂与 MMP-9 之间相互作用的等温量热实验。将肽溶解在 20mM 二甲胍酸盐 (pH6.8)，20mM NaCl 中，使终浓度达到 1mM。将 MMP-9 透析到相同的缓冲液中，终浓度为 20 $\mu$ M。一系列标准注射是按照上面所述进行的。MMP-9 与 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 之间相互作用的结果如下：

化学计量:	0.975 $\pm$ 0.02
$\Delta H$ (kcal/mol):	-26.1 $\pm$ 1.45
$\Delta S$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ):	-11.6 $\pm$ 2.2
$K_A$ (M <sup>-1</sup> ):	1.65 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 4.5 x 10 <sup>4</sup>

这些结果表明 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽与 MMP-9 之间的相互作用是焓驱动的， $\Delta H$  为负值。通过  $\Delta S$  为负值可证实该反应不是熵促进的。然而，焓这个术语的数量级比术语  $T\Delta S$  要大，因此，总的自由能 ( $\Delta G$ ) 都是负值。

我们观察到了 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 与 MMP-2 的反应，并发现该反应是焓驱动的，并且是熵不利的。图 14 所示的等温量热分析是通过使用 MMP-2 滴定 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 产生的。下列值就是从这些实验获得的。

化学计量:	0.99 $\pm$ 0.03
$\Delta H$ (kcal/mol):	-15.4 $\pm$ 2.05
$\Delta S$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ):	-21.1 $\pm$ 1.8
$K_A$ (M <sup>-1</sup> ):	2.40 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 3.7 x 10 <sup>4</sup>

因此，结合反应是熵不利的。这大概是由于结合后构型熵的损耗

造成的。完全柔韧的肽含有大量自由度。在所有结合情况中，肽与 MMP 化学计量为 1:1，表明单一的 19 聚体 (SEQ ID NO:11) 肽可与单一的 MMP 分子相互作用。

#### 表面等离子共振

- 5        19 聚体 (SEQ ID NO:11) 与 MMP-9 结合的动力学研究是使用表面等离子共振 (SPR) 技术进行的。传感器芯片是按照制造商推荐的标准化学把活性 MMP-9 连接在 BIACore, Inc. 的 CM-5 芯片的表面而构造的。使 19 聚体 (SEQ ID NO:11) 在 BIACore-X™ 仪器中的 MMP-9 表面上流动，并实时监测结合及解离。典型的结合等温线在图 15 中表示。缔合相 (30-430 秒) 与单一的结合位点模型最佳拟合，并产生  $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  的缔合速率常数。解离相 (440-700 秒) 同样拟合，并产生  $4.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  的解离速率常数 ( $k_d$ )。计算出来的  $5.3 \times 10^6$  的平衡缔合常数 ( $K_a = k_a/k_d$ ) 与热力学数据非常一致。在解离开始时，观察到约 100 个反应单位的批量转运作用，它没有模型化。因此，19 聚体 (SEQ ID NO:11) 肽与 MMP-9 的结合是动力学和热力学促进的。

#### 存活力测定法

- 与很多小分子 MMP 抑制剂不同，当把本研究中的三个肽给予 EpiDerm™ 皮肤模型时，它们对细胞是无毒的。图 16 表示，与 PBS 对照组相比，两个浓度 (500  $\mu\text{M}$  和 2mM) 的肽都仅导致存活力稍稍降低。肽的总平均存活力为 97.6% (19 聚体 (SEQ ID NO:11))，89.6% (10 聚体 (SEQ ID NO:13))，和 95.8% (9 聚体 (SEQ ID NO:12))。这些结果表明，用于慢性创伤愈合的这种肽治疗方法对于哺乳动物细胞是无毒的。图 16 中标绘的数据是三份样品的平均值。该研究存活力的标准差为 2.2-3.7，而且与剂量或肽的同一性无关。肽浓度较高时，存活力稍低。

这些结果显示，EpiDerm™ 皮肤模型中的肽是无毒的，它们是动力学和熵促进的，从而与 MMP 形成结合复合物，而且它们可抑制酶活性并防止基质金属蛋白酶活化。

#### 实施例 2: 利用肽抑制剂使创伤愈合

##### 方法

创伤是用 4mm 的活检钻孔器在 C57BL6/KsJ db/db 小鼠中制造的。小鼠从 Jackson Laboratories 获得，在开始进行创伤方案前，年龄

为 3-7 个月。在制造创伤前，将所有小鼠麻醉。将皮肤拉离下面的结构，并使钻孔器穿过分离开的皮肤，从而在每只动物的上背部引入两处创伤。通常，所制造创伤的平均深度为 1.7mm，范围在 1.3-2.2mm。在制造创伤的过程中没有累及肌肉。创伤形成后，立即用标准盐水（作为非治疗对照组）或 5μL 20μg/mL 的 19 聚体肽 (SEQ ID NO: 11) 治疗。

每天都要对创伤进行数字照相，并通过使用计算机求照片的积分而测定创伤面积。所有创伤的治疗和随后的数据分析都是以盲法进行的（见，例如，Brown 等，1994）。对所有创伤而言，将形成创伤时（第 0 天）的创伤面积任意设置为 1 的相对值；这样就可通过用第 n 天的创伤面积除以第 0 天的创伤面积而把后来的创伤面积转化成相对创伤面积。

结果：

从图 17 可看出，单一剂量 19 聚体肽的使用（在形成创伤时，第 0 天）可大大促进糖尿病小鼠模型中全部创伤闭合的时间。用 19 聚体肽处理过的创伤平均在形成创伤后的 9 天内闭合，而用盐水对照组处理过的创伤则在 14 天内闭合。此外，用 19 聚体肽 (SEQ ID NO: 11) 处理过的创伤显示出，炎症在创伤形成后的第 1 天减轻。此外还观察到，与盐水对照组处理过的相比，用 19 聚体肽 (SEQ ID NO: 11) 处理过的创伤开始收缩的过程更快（5 天: 8 天）。

#### 20 实施例 3: 肽抑制剂抑制 VEGF 表达

在该实验中，检验了 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽以确定其是否可以刺激血管发生，允许其建立血管而作为创伤愈合的一种手段，或者其是否具有抑制血管形成的抗血管发生特性。将 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽或其亚单位加入在完全和碱性培养基中生长的人新生儿皮肤成纤维细胞 (NHDF)，并且温育 24 小时。然后用 VEGF 引物在细胞样品上进行逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR)，用 β 肌动蛋白的引物作为对照。如果 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 促进血管化而作为创伤愈合的一种手段，VEGF 的表达水平将增加。然而，如果 19 聚体 (SEQ ID NO: 11) 不诱导血管化，与未处理的阴性对照相比，VEGF 的水平将降低。也用作刺激 VEGF 表达的阳性对照的氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 处理的细胞。

#### 材料和方法

用于 RT-PCR 的引物如下：



$\beta$ 肌动蛋白的PCR引物 (Hs. 288061)

$\beta$ 肌动蛋白编码链-20 nt

5'-AGT CGG TTG GAG CGA GCA TC-3' (SEQ ID NO: 19)

$\beta$ 肌动蛋白非编码链-20 nt

5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3' (SEQ ID NO: 20)

VEGF 的PCR引物 (Hs. 334842)

VEGF编码链-20 nt

5'-GCC ACC ACA CCA TCA CCA TC-3' (SEQ ID NO: 22)

VEGF非编码链-20 nt

5'-CCC AAA GCA CAG CAA TGT CC-3' (SEQ ID NO: 23)

为检验19聚体 (SEQ ID NO: 11) 的体外血管发生特性, 在T25烧瓶中的含有胰岛素、hFGF- $\beta$ 、GA-1000和胎牛血清 (10 mL) 的完全FBM培养基 (500 mL, Biowhittaker) 中增殖正常人新生儿皮肤成纤维细胞 (NHDF, Biowhittaker, Walkersville, Maryland)。在cFBM和转变至仅含有GA-100的FBM (500 mL, Biowhittaker) 的培养基中生长至60%汇合后检验成纤维细胞。然后在碱性培养基中使这些细胞生长24小时, 然后引入对照19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽和对照试剂。

通过SigmaGenesis合成和纯化肽, 并且在HPLC后通过质谱分析纯度。用大约20mg肽制备含有溶于PBS的浓度为10 mg/mL的新鲜原液, 用200  $\mu$ l该原液向每个T25烧瓶中定量加入成纤维细胞。在达到75%汇合后定量加入成纤维细胞, 并且在37 $^{\circ}$ C/5% CO<sub>2</sub>下温育过夜。

在所述肽抑制剂存在下温育后, 使用无苯酚总RNA分离试剂盒 (Ambion, Austin, TX) 从成纤维细胞提取RNA。为了从成纤维细胞提取RNA, 将来自该试剂盒的750  $\mu$ l裂解缓冲液加入每个T25烧瓶。用小细胞刮刀刮烧瓶, 并且收集在微量离心管中。按照制造商的程序从细胞提取总RNA。

为了将RNA转化至cDNA, 使用来自于Genisphere (Montvale, NJ) 的3DNA表达阵列检测试剂盒的部分。使用的程序如下: 将按上述方法分离的3  $\mu$ L总RNA与3  $\mu$ L RT引物 (0.2 pmole) (Cy5 RT Primer Oligo 0.067 pMole/ml) 和4  $\mu$ L DEPC处理的水 (Ambion) 混合。将该混合物加热至80 $^{\circ}$ C 10分钟, 放置在冰上10分钟, 然后离心。在另一试管中混合以下试剂: 4  $\mu$ L 5X RT缓冲液、1  $\mu$ L dNTP混合物、4  $\mu$ L DEPC处理的水 (Ambion) 和1

$\mu\text{L}$ 逆转录酶(200单位/ $\text{mL}$ )。将 $10\mu\text{L}$  RNA加引物的混合物与 $10\mu\text{L}$ 逆转录酶溶液混合,产生 $20\mu\text{L}$ 反应混合物。在 $42^\circ\text{C}$ 下温育反应混合物2小时。该反应的产物是用于PCR的 cDNA。

将两组引物用于PCR。对照引物包括 $\beta$ 肌动蛋白(Hs. 288061)编码链引物: 5'-AGT CGG TTG GAG CGA GCA TC-3' (SEQ ID NO: 19)和 $\beta$ 肌动蛋白非编码链引物5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3' (SEQ ID NO: 20)。VEGF引物组(Hs. 334842)包括VEGF编码链5'-GCC ACC ACA CCA TCA CCA TC-3' (SEQ ID NO: 22)和VEGF非编码链5'-CCC AAA GCA CAG CAA TGT CC-3' (SEQ ID NO: 23)。将 $\beta$ 肌动蛋白引物用作通用对照,因为 $\beta$ 肌动蛋白RNA在大多数细胞类型中以显著量存在。在使用的测定中, $\beta$ 肌动蛋白RNA产生了约300bp的RT-PCR带,而VEGF RNA产生了约760bp的RT-PCR带。

对于每个PCR反应,混合以下试剂:  $2\mu\text{L}$  cDNA、 $38\mu\text{L}$  PCR级水、 $5\mu\text{L}$  10X Advantage™ 2 PCR缓冲液(Clontech)、 $1\mu\text{L}$  50X Advantage™ 2 dNTP 混合物(Clontech)。涡旋含该PCR反应混合物的试管,反转,然后置于热循环仪中。热循环仪程序如下:热起始( $95^\circ\text{C}$ , 5min.),然后是一系列可变循环(15-25),  $95^\circ\text{C}$  (30 sec.),  $65^\circ\text{C}$  (1 min.),  $68^\circ\text{C}$  (3min.),最后是 $68^\circ\text{C}$ 下10分钟的补齐步骤。当完成PCR反应时,在2%琼脂糖凝胶上对 $10\mu\text{L}$ 反应混合物进行电泳,以进行显现。带的强度与VEGF基因和 $\beta$ 肌动蛋白的表达水平成比例。

为进一步证实所观察到的VEGF表达的改变,用Quantikine™人VEGF免疫测定(R & D Systems, MN)检验在19聚体(SEQ ID NO: 11)处理的cFBM中生长并且温育过夜的成纤维细胞的培养基。当细胞培养物上清液存在可检测水平的分泌的VEGF时,该免疫测定产生了颜色改变。采用此免疫测定,阳性试剂盒对照正确工作并且提供颜色改变。然而,来自于 $\text{CoCl}_2$ 阳性对照的上清液样品、阴性对照和19聚体(SEQ ID NO: 11)处理的细胞没有表现出任何可检测的VEGF活性。这被认为是与培养基中的低VEGF浓度相联系,因此随后在Centricon™过滤装置(Micon)上浓缩上清液,并且用更浓缩的上清液再次尝试Quantikine™测定。该测定再次表现出相同的阴性结果。

## 结果

成纤维细胞(NHDF)对用于该实验是理想的,因为它们在创伤愈合的

增殖期是常见的。未处理的成纤维细胞用作阴性对照。在相同的条件下 (37°C/50CO<sub>2</sub>) 在温育箱中维持所有细胞。对于处理过的样品, 在培养基转变过程中将200 μL 19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽与5mL cFBM一起加入 T25烧瓶。在取样前温育过夜。为了作为这些实验的阳性对照, 用5 μL 100 μM氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 处理NHDF细胞4小时。已知氯化钴诱导或上调VEGF的表达但随时间对细胞有毒性。

当用19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽处理时, 在cFBM中标准条件下生长的成纤维细胞显著降低VEGF表达水平, 这是由RT-PCR所指示的。这些水平甚至显著低于阴性对照所观察到的VEGF表达水平。在含有19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽处理的细胞的PCR RT产物的2%琼脂糖凝胶的照片中, VEGF带几乎不可见 (图18)。相反, 阴性对照产生了微弱但可分辨的带 (图18)。通过RT-PCR观察时, 氯化钴的使用提供了与阴性对照相比的预料到的VEGF表达的上调。

图19和20进一步说明, 使用200 μL 10mg/ml的19聚体 (SEQ ID NO: 11), 19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽显著基本抑制了成纤维细胞中的所有VEGF表达。

为了比较并计算19聚体 (SEQ ID NO: 11) 与阴性对照的表达水平, 使用了称作ImageQuant (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia) 的程序对带的表达水平进行定量。采用此程序, 在感兴趣的带周围画一个框, 并且从总体背景中扣除, 然后与阴性对照相比。对阴性对照、CoCl<sub>2</sub>和19聚体 (SEQ ID NO: 11) 进行计算。这三种样品的表达水平见表5。

表5: 定量的表达水平

	阴性对照	CoCl <sub>2</sub>	19聚体
β 肌动蛋白	61358	69519	83909
VEGF	42923	119094	1
校正的VEGF	42923	105113	0.7312
比值	1	1.3546	$1.703 \times 10^{-5}$

如表5中所见, CoCl<sub>2</sub>上调VEGF的表达, 而19聚体 (SEQ ID NO: 11) 显著下调表达水平 - 甚至低于对照组。在不同日中使用从不同T25烧瓶中得到的在cFBM中生长的NHDF细胞重复该实验数次, 以获得用于取样的新的总RNA。该结果是高度可重复的, 总是表示与未处理的和阴性对照处理的细胞相比, VEGF在19聚体 (SEQ ID NO: 11) 处理的成纤维细胞中下调。

如实施例2中所示, 19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽的应用显著加速了实验的糖尿病小鼠模型中的完全创伤闭合。在成年动物中, 除创伤愈合、胚胎发育和肿瘤形成时, 通常没有血管发生。出乎意料的是, 该19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽似乎没有血管发生特性, 相反, 甚至与已知降低VEGF表达水平的阴性对照化合物相比也提供了显著阻遏的VEGF水平。

目前抗血管发生肽和分子被用于在肿瘤和其它血管发生疾病的调节中抑制血管发生。Endostatin™和Angiostatin™是用于肿瘤生长调节的两种有效蛋白 (Kim, Y. et al. Endostatin™ blocks VEGF-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. J Biol Chem 2002; May 23)。19聚体 (SEQ ID NO: 11) 肽也可以阻遏血管形成, 因为它下调 VEGF 血管发生基因的表达。

## 参考文献

以下参考文献和此处引用的任何其它参考文献都在此引入作为参考。

- Agren, M.S. (1999). Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 583-590.
- Baker, E., et al. Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. *Wound Repair Regen.* 2000 Sep-Oct; 8(5): 392-8.
- Becker, J.W., Marcy, A.I., Rokosz, L.L., Axel, M.G., Burbaum, J.J., Fitzgerald, P.M., Cameron, P.M., Esser, C.K., Hagmann, W.K., Hermes, J.D., and Springer, J.P. (1995). Stromelysin-1: Three dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci.* 4, 1966-76.
- Brown, R.L., Breeden, M.P., and Greenhalgh, M.D., (1994). PDGF and TGF- $\alpha$  act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *J. Surg. Res.* 56, 562-570.
- Browner, M.F., Smith, W.W., Castelhana, A.L. (1995). Matrilysin-inhibitor complexes: Common themes among 18 metalloproteinases. *Biochemistry* 34, 6602-10.
- Calvin, M. Cutaneous wound repair. *Wounds* 1998; 10(1): 12-32.
- Di Colandrea, T., Wang, L., Wille, J., D'Armiento, J., and Chada, K.K. (1998). Epidermal expression of collagenase delays wound healing in transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 111, 1029-1033.
- Duivenvoorden, W.C.M., Hirte, H.W., and Singh, G. (1997). Use of tetracycline as an inhibitor of matrix metalloproteinase activity secreted by human bone metastasizing cancer cells. *Invasion and Metas.* 17, 312-322.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, A., Tschesche, H., and Maskos, K. (1998). Crystal structure of the complex formed by membrane type-1 matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble procollagenase A receptor. *EMBO J.* 17, 5238-48.
- Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., and Sanchez-Ruiz, J.M. (1990). Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 19, 159-88.
- Gomis-Ruth, F.X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H., and Bode, W. (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by

- TIMP-1. *Nature* 389, 77-81.
- Grams, F., Reinemer, P., Powers, J.C., Kleine, T., Pieper, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. (1995). X-ray structures of human neutrophil collagenase complexed with peptide hydroxamate and peptide thiol inhibitors: Implications for substrate binding and rational drug design. *Eur. J. Biochem.* 228, 830-834.
- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997). Swiss Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J., and Fuchs, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci.* 8(2), 189-91.
- Howard, E.W., Bullen, E.C., and Banda, M.J. (1991). Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.* 266, 13070-13075.
- Huang, W., Suzuki, K., Nagase, H., Arumugam, S., Van Doren, S.R., and Brew, K. (1996). Folding and characterization of the amino terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Lett.* 384, 155-161.
- Karlsson, R., and Falt, A. (1997). Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J. Immunol. Meths.* 200, 121-33.
- Kim, Y. et al. Endostatin blocks VEGF-mediated signaling via direct interaction with KDR/Fik-1. *J Biol Chem* 2002; May 23.
- Lakowicz, J.R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Chapter 10, Plenum Press, New York, London.
- Levenson, S., et al. The Healing of Rat Skin Wounds. *Ann. Surg.* 1965; 161: 293-308.
- Levit, S., and Berger, A. (1976). Ribonuclease S-peptide. A model for molecular recognition. *J. Biol. Chem.* 251, 1333-9.
- Levy, D.E., Lapierre, F., Liang, W., Ye, W., Lange, C.W., Li, X., Grobelny, D., Casabonne, M., Tyrrell, D., Holme, K., Nadzan, A., and Galaray, R.E. (1998). Matrix metalloproteinase inhibitors: A structure activity study. *J. Med. Chem.* 41, 199-223.
- Li, J., Brick, P., O'Hare, M. C., Skarzynski, T., Lloyd, L. F., Curry, V. A., Clark, I. M., Bigg, H. F., Hazleman, B. L., Cawston, T. E. et al. (1995). Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-

- linked, four-bladed beta-propeller. *Structure* 3, pp. 541-49.
- Libson, A.M., Gittis, A.G., Collier, I.E., Marmer, B.L., Goldberg, G.I., and Lattman, E.E. (1995). Crystal structure of the haemopexin-like C terminal domain of gelatinase A. *Nat. Struct. Biol.* 2, 938-42.
- Lofas, S., Johnsson, B., Tegendahl, K., and Ronnberg, I. (1993). Dextran modified gold surfaces for surface plasmon resonance biosensors; immunoreactivity of immobilized antibodies and antibody-surface interaction studies. *J. Colloid Interface Sci.* 65, 423-431.
- Morton, T.A., Myska, D.G., and Chaiken, I.M. (1995). Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: A comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal. Biochem.* 227, 176-185.
- Moses, M.A., Marikovsky, M., Harper, J.W., Vogt, P., Eriksson, E., Klagsbrun, M. and Langer, R. (1996). Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *J. Cell. Biochem.* 60, 379-386.
- Nwomech, B., et al. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Repair Regen.* 1998 Mar-Apr; 6(2): 127-34.
- Odake, S., Morita, Y., and Morikawa, T. (1994). Inhibition of matrix metalloproteinases by peptidyl hydroxamic acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199, 1442-1446.
- Olson, M.W., Gervasi, D.C., Mobashery, S., and Fridman, R. (1997). Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase 2 and 9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J. Biol. Chem.* 272, 29975-29983.
- O'Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M., Sonesson, K.K, Hensley, P., and Brooks, I. (1993). Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of non linear least squares analysis methods. *Anal. Biochem.* 212, 457-468.
- Reinemer, P., Grams, F., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S., Pieper, M., Tschesche, H., Bode, W. (1994). Structural implications for the role of the N terminus in the superactivation of collagenases: A crystallographic study. *FEBS Lett.* 338, 227-33.
- Saarialho-Kere, U.K. (1998). Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch. Dermatol. Res.* 290 (suppl), 47-54.
- Sayle, R.A. and Milner-White, E.J. (1995). RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends*

- in *Biochemical Sciences* 20, 374-376.
- Segel, I.H. (1993) *Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Wiley Classics Library, John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Singer, A. J., et al. Cutaneous Wound Healing. *New Eng. J. of Med.* 1999; Vol.341, No. 10:738-746.
- Su, J-L., Becherer, D., Edwards, C., Bukhart, W., McMgeeahan, G.M., and Champion, B.R. (1995). Monoclonal antibodies against human collagenase and stromelysin. *Hybridoma*. 14, 383-390.
- Taylor, K.B., Windsor, J.L., Caterina, N.C.M., Bodden, M.K., and Engler, J.A. (1996). The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1. *J. Biol. Chem.* 271, 23938-23945.
- Tuuttila, A., Morgunov, E., Bergmann, U., Lindqvist, Y., Maskos, K., Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Tryggvason, K., and Schneider, G. (1998). Three dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 284, 1133-1140.
- U.S. markets for wound management products. Irvine, Calif.: Medical Data International, Aug. 1997.
- Vaalamo, M., Weckroth, M., Puolakkainen, P., Kere, J., Saarinen, P., Lauharanta, J., and Saarialho-Kere, U.K. (1996). Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *Brit. J. Dermatol.* 135, 52-59.
- Vaalamo, M., Mattila, L., Johansson, N., Kariniemi, A-L., Karjalainen-Lindsberg, L., Kahari, V-M., and Saarialho-Kere, U.K. (1997). Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers, but not in normally healing wounds. *J. Investig. Dermatol.* 109, 96-101.
- Weckroth, M., Vaheri, A., Lauharanta, J., Sorsa, T., and Kontinen, Y.T. (1996). Matrix metalloproteinases, gelatinases, and collagenases in chronic leg ulcers. *J. Investig. Dermatol.* 108, 1119-1124.
- Wojtowicz-Praga, S.M., Dickson, R.B., and Hawkins, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational new Drugs*. 15, 61-75.



---

 序列表

&lt;110&gt; S. 夸克

I. F. 沃特

&lt;120&gt; 抗癌并使创伤愈合的化合物

&lt;130&gt; 17950

&lt;150&gt; US 10/032,376

&lt;151&gt; 2001-12-21

&lt;150&gt; US 60/312,726

&lt;151&gt; 2001-08-16

&lt;160&gt; 23

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val

1

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 2

Met Gln Lys Phe Phe Gly Leu Pro Gln Thr Gly Asp Leu Asp Gln Asn

1

5

10

15

Thr Ile Glu Thr Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala

20

25

30

Asn Tyr Asn Phe Phe Pro Arg Lys Pro Lys Trp Asp

35

40

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 3

```

Met Gln Ser Phe Phe Gly Leu Glu Val Thr Gly Lys Leu Asp Asp Asn
 1             5             10             15
Thr Leu Asp Val Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Gly
          20          25          30
Glu Tyr Asn Val Phe Pro Arg Thr Leu Lys Trp Ser Lys Met Asn Leu
          35          40          45
Thr Tyr
          50

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 4

```

Met Gln Lys Phe Phe Gly Leu Pro Glu Thr Gly Lys Leu Ser Pro Arg
 1             5             10             15
Val Met Glu Ile Met Gln Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Ala
          20          25          30
Glu Phe Ser Leu Met Pro Asn Ser Pro Lys Trp His Ser Arg Thr Val
          35          40          45
Thr Tyr Arg Ile Val Ser Tyr Thr
          50          55

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 5

```

Met Gln Lys Phe Leu Gly Leu Glu Val Thr Gly Lys Leu Asp Ser Asp
 1             5             10             15
Thr Leu Glu Val Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Gly
          20          25          30
His Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His Leu
          35          40          45
Thr Tyr Arg Ile Val Asn
          50

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 6

```

Met Gln Lys Phe Leu Gly Leu Glu Val Thr Gly Lys Leu Asp Thr Asp
 1             5             10             15

```

---

Thr Leu Glu Val Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Gly  
                   20                  25                  30  
 His Phe Ser Ser Phe Pro Gly Met Pro Lys Trp Arg Lys Thr His Leu  
                   35                  40                  45  
 Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr  
           50                  55

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 7

Met Gln His Phe Leu Gly Leu Lys Val Thr Gly Gln Leu Asp Thr Ser  
   1                  5                  10                  15  
 Thr Leu Glu Met Met His Ala Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val His  
                   20                  25                  30  
 His Phe Arg Glu Met Pro Gly Gly Pro Val Trp Arg Lys His Tyr Ile  
                   35                  40                  45  
 Thr Tyr Arg Ile Asn Asn  
           50

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 8

Leu Gln Lys Gln Leu Ser Leu Pro Glu Thr Gly Glu Leu Asp Ser Ala  
   1                  5                  10                  15  
 Thr Leu Lys Ala Met Arg Thr Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Leu Gly  
                   20                  25                  30  
 Arg Phe Gln Thr Phe Glu Gly Asp Leu Lys Trp His His His Asn  
                   35                  40                  45

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 9

Met Gln Glu Phe Phe Gly Leu Lys Val Thr Gly Lys Pro Asp Ala Glu  
   1                  5                  10                  15  
 Thr Leu Lys Val Met Lys Gln Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Ala  
                   20                  25                  30  
 Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly Asn Pro Arg Trp Glu Gln Thr His Leu  
                   35                  40                  45  
 Thr Tyr Arg Ile Glu Asn

50

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 10

Met Gln Arg Phe Phe Gly Leu Asn Val Thr Gly Lys Pro Asn Glu Glu

1 5 10 15

Thr Leu Asp Met Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Ser Gly

20 25 30

Gly Phe Met Leu Thr Pro Gly Asn Pro Lys Trp Glu Arg Thr Asn Leu

35 40 45

Thr Tyr Arg Ile Arg Asn Tyr

50 55

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 11

Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala Asn Tyr Asn Phe Phe Pro Arg

1 5 10 15

Lys Pro Lys

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 12

Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala

1 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 13

Asn Tyr Asn Phe Phe Pro Arg Lys Pro Lys

1 5 10

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 660

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 14

```

Met Glu Ala Leu Met Ala Arg Gly Ala Leu Thr Gly Pro Leu Arg Ala
 1           5           10           15
Leu Cys Leu Leu Gly Cys Leu Leu Ser His Ala Ala Ala Pro Ser
          20           25           30
Pro Ile Ile Lys Phe Pro Gly Asp Val Ala Pro Lys Thr Asp Lys Glu
          35           40           45
Leu Ala Val Gln Tyr Leu Asn Thr Phe Tyr Gly Cys Pro Lys Glu Ser
          50           55           60
Cys Asn Leu Phe Val Leu Lys Asp Thr Leu Lys Lys Met Gln Lys Phe
65           70           75           80
Phe Gly Leu Pro Gln Thr Gly Asp Leu Asp Gln Asn Thr Ile Glu Thr
          85           90           95
Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala Asn Tyr Asn Phe
          100          105          110
Phe Pro Arg Lys Pro Lys Trp Asp Lys Asn Gln Ile Thr Tyr Arg Ile
          115          120          125
Ile Gly Tyr Thr Pro Asp Leu Asp Pro Glu Thr Val Asp Asp Ala Phe
          130          135          140
Ala Arg Ala Phe Gln Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Arg Phe Ser
145          150          155          160
Arg Ile His Asp Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Asn Phe Gly Arg Trp
          165          170          175
Glu His Gly Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys Asp Gly Leu Leu Ala
          180          185          190
His Ala Phe Ala Pro Gly Thr Gly Val Gly Gly Asp Ser His Phe Asp
          195          200          205
Asp Asp Glu Leu Trp Thr Leu Gly Glu Gly Gln Val Val Arg Val Lys
          210          215          220
Tyr Gly Asn Ala Asp Gly Glu Tyr Cys Lys Phe Pro Phe Leu Phe Asn
225          230          235          240
Gly Lys Glu Tyr Asn Ser Cys Thr Asp Thr Gly Arg Ser Asp Gly Phe
          245          250          255
Leu Trp Cys Ser Thr Thr Tyr Asn Phe Glu Lys Asp Gly Lys Tyr Gly
          260          265          270
Phe Cys Pro His Glu Ala Leu Phe Thr Met Gly Gly Asn Ala Glu Gly
          275          280          285
Gln Pro Cys Lys Phe Pro Phe Arg Phe Gln Gly Thr Ser Tyr Asp Ser
          290          295          300
Cys Thr Thr Glu Gly Arg Thr Asp Gly Tyr Arg Trp Cys Gly Thr Thr
305          310          315          320
Glu Asp Tyr Asp Arg Asp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Pro Glu Thr Ala
          325          330          335
Met Ser Thr Val Gly Gly Asn Ser Glu Gly Ala Pro Cys Val Phe Pro
          340          345          350

```

---

1	5	10	15
Thr Ile Glu Thr Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala			
20	25	30	
Asn Tyr Asn Phe Phe Pro Arg Lys Pro Lys Trp			
35	40		

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 16

Leu Gln Lys Gln Leu Ser Leu Pro Glu Thr Gly Glu Leu Asp Ser Ala
1 5 10 15
Thr Leu Lys Ala Met Arg Thr Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Leu Gly
20 25 30
Arg Phe Gln Thr Phe Glu Gly Asp Leu Lys Trp
35 40

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 17

Met Gln Glu Phe Phe Gly Leu Lys Val Thr Gly Lys Pro Asp Ala Glu
1 5 10 15
Thr Leu Lys Val Met Lys Gln Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Ala
20 25 30
Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly Asn Pro Arg Trp
35 40

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 能够抑制金属蛋白酶活性的肽

&lt;221&gt; 位点

&lt;222&gt; 2

&lt;223&gt; Xaa = 谷氨酰胺或谷氨酸

&lt;221&gt; 位点

&lt;222&gt; 5

&lt;223&gt; Xaa = 天门冬氨酸或谷氨酸

- 
- <221> 位点  
<222> 8  
<223> Xaa = 谷氨酰胺或丝氨酸
- <221> 位点  
<222> 9  
<223> Xaa = 天门冬酰胺或丙氨酸
- <221> 位点  
<222> 11  
<223> Xaa = 异亮氨酸或亮氨酸
- <221> 位点  
<222> (12)... (12)  
<223> Xaa = 谷氨酸或赖氨酸
- <221> 位点  
<222> (13)... (13)  
<223> Xaa = 苏氨酸或丙氨酸
- <221> 位点  
<222> (16)... (16)  
<223> Xaa = 赖氨酸或苏氨酸
- <221> 位点  
<222> (21)... (21)  
<223> Xaa = 缬氨酸或天门冬酰胺
- <221> 位点  
<222> (24)... (24)  
<223> Xaa = 缬氨酸或亮氨酸
- <221> 位点  
<222> (25)... (25)  
<223> Xaa = 丙氨酸或甘氨酸
- <221> 位点  
<222> (26)... (26)  
<223> Xaa = 天门冬酰胺或精氨酸
- <221> 位点  
<222> (27)... (27)  
<223> Xaa = 酪氨酸或苯丙氨酸
- <221> 位点  
<222> (28)... (28)  
<223> Xaa = 天门冬酰胺或谷氨酰胺

<221> 位点  
 <222> (29)... (29)  
 <223> Xaa = 苯丙氨酸或苏氨酸

<221> 位点  
 <222> (31)... (31)  
 <223> Xaa = 脯氨酸或谷氨酸

<221> 位点  
 <222> (32)... (32)  
 <223> Xaa = 精氨酸或甘氨酸

<221> 位点  
 <222> (33)... (33)  
 <223> Xaa = 赖氨酸或天门冬氨酸

<221> 位点  
 <222> (34)... (34)  
 <223> Xaa = 脯氨酸或亮氨酸

<400> 18  
 Pro Xaa Thr Gly Xaa Leu Asp Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Met Arg Xaa  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Cys Gly Xaa Pro Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Lys  
 35

<210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 19  
 agtcggttgg agcgagcatc 20

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 20  
 gggcacgaag gctcatcatt 20

<210> 21  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



<220>  
<223> 能够抑制金属蛋白酶活性的肽

<221> 位点  
<222> 2  
<223> Xaa = 谷氨酰胺或谷氨酸

<221> 位点  
<222> 5  
<223> Xaa = 天门冬氨酸或谷氨酸

<221> 位点  
<222> 8  
<223> Xaa = 谷氨酸或丝氨酸

<221> 位点  
<222> 9  
<223> Xaa = 天门冬酰胺或丙氨酸

<221> 位点  
<222> 11  
<223> Xaa = 异亮氨酸或亮氨酸

<221> 位点  
<222> (12)... (12)  
<223> Xaa = 谷氨酸或赖氨酸

<221> 位点  
<222> (13)... (13)  
<223> Xaa = 苏氨酸或丙氨酸

<221> 位点  
<222> (16)... (16)  
<223> Xaa = 赖氨酸或苏氨酸

<221> 位点  
<222> (17)... (17)  
<223> Xaa = 任何非极性氨基酸

<221> 位点  
<222> (18)... (18)  
<223> Xaa = 任何碱性氨基酸

<221> 位点  
<222> (19)... (19)  
<223> Xaa = 任何半胱氨酸样氨基酸

- 
- <221> 位点  
<222> (20)... (20)  
<223> Xaa = 任何非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (21)... (21)  
<223> Xaa = 任何极性或脂族氨基酸
- <221> 位点  
<222> (22)... (22)  
<223> Xaa = 任何非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (23)... (23)  
<223> Xaa = 任何酸性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (24)... (24)  
<223> Xaa = 任何脂族或极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (25)... (25)  
<223> Xaa = 任何脂族、非极性或非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (26)... (26)  
<223> Xaa = 任何极性、酸性、碱性或非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (27)... (27)  
<223> Xaa = 任何极性或非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (28)... (28)  
<223> Xaa = 任何极性、碱性、脂族或非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (29)... (29)  
<223> Xaa = 任何芳族、脂族、极性或非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (30)... (30)  
<223> Xaa = 任何芳族、非极性或非极性氨基酸
- <221> 位点  
<222> (31)... (31)  
<223> Xaa = 任何非极性或非极性氨基酸

<221> 位点  
<222> (32)... (32)  
<223> Xaa = 任何碱性、极性或非极性氨基酸

<221> 位点  
<222> (33)... (33)  
<223> Xaa = 任何碱性、极性、脂族、非极性或酸性氨基酸

<221> 位点  
<222> (34)... (34)  
<223> Xaa = 任何极性或非极性氨基酸

<221> 位点  
<222> (35)... (35)  
<223> Xaa = 任何碱性或非极性氨基酸

<400> 21  
Pro Xaa Thr Gly Xaa Leu Asp Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Met Arg Xaa  
1 5 10 15  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30  
Xaa Xaa Xaa  
35

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人

<400> 22  
gccaccacac catcaccatc 20

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人

<400> 23  
cccaaagcac agcaatgtcc 20

```

nmp2:  MQKFFGLPQTGDLDDQNTIETMRKPRCGNPDVANYNFFPRKPKWD-----
nmp13:  MQSFFGLEVTGKLDNDNTLDVMKKPRCGVPDVGEYNVFPRTLKWSKMNLTY-----
nmp7:   MQKFFGLPETGKLSPRVMEIMQKPRCGVPDVAEFSLMPNSPKWHSRTVTYRIVSYT
nmp3:   MQKFLGLEVTGKLDSDTLEVMRKPRCGVPDVGHFRTFPGIPKWRKTHLTYRIVN--
nmp10:  MQKFLGLEVTGKLDTDTEVMRKPRCGVPDVGHFSSFPMPKWRKTHLTYRIVNY-
nmp12:  MQHFLGLKVTGQLDTSITLEMMHAPRCGVPDVHGHFREMPPGVPWRKHYYITYRINN--
nmp9:   LQKQLSLPETGELDSATLKAMRTPRCGVPDVGRLGRFQTFEGDLKWHHHN-----
nmp1:   MQEFFFGLKVTGKPDAAETLKVMKQPRCGVPDVAQFVLTEGNPRWEQTHLTYRIEN--
nmp8:   MORFFFGLNVTGKPNEEETLDMMKKPRCGVPDSDGGFMFLTPGNPKWERTNLTyrIRNY-
: * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

图 1A

```

nmp2:  MQKFFGLPQTGDLDDQNTIETMRKPRCGNPDVANYNFFPRKPKWD-----
nmp13:  MQSFFGLEVTGKLDNDNTLDVMKKPRCGVPDVGEYNVFPRTLKWSKMNLTY-----
nmp7:   MQKFFGLPETGKLSPRVMEIMQKPRCGVPDVAEFSLMPNSPKWHSRTVTYRIVSYT
nmp3:   MQKFLGLEVTGKLDSDTLEVMRKPRCGVPDVGHFRTFPGIPKWRKTHLTYRIVN--
nmp10:  MQKFLGLEVTGKLDTDTEVMRKPRCGVPDVGHFSSFPMPKWRKTHLTYRIVNY-
nmp12:  MQHFLGLKVTGQLDTSITLEMMHAPRCGVPDVHGHFREMPPGVPWRKHYYITYRINN--
nmp9:   LQKQLSLPETGELDSATLKAMRTPRCGVPDVGRLGRFQTFEGDLKWHHHN-----
nmp1:   MQEFFFGLKVTGKPDAAETLKVMKQPRCGVPDVAQFVLTEGNPRWEQTHLTYRIEN--
nmp8:   MORFFFGLNVTGKPNEEETLDMMKKPRCGVPDSDGGFMFLTPGNPKWERTNLTyrIRNY-

```

图 1B

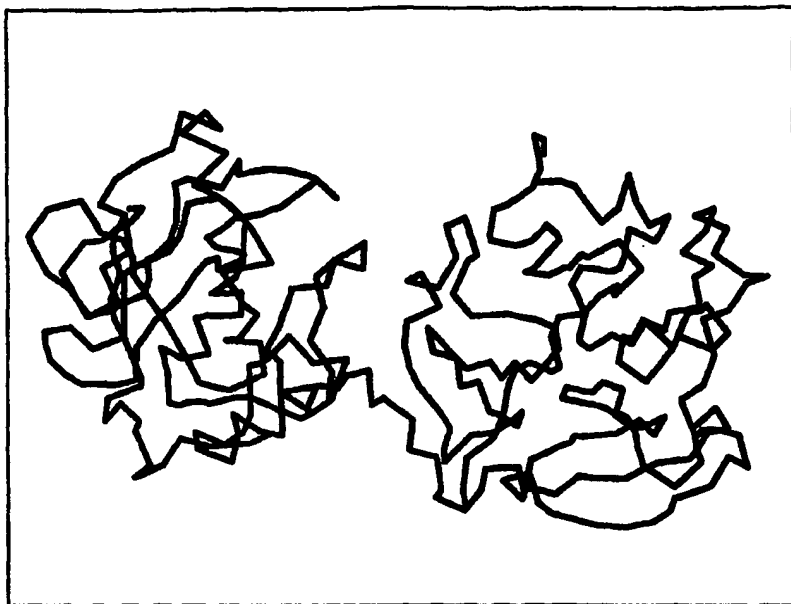


图 2

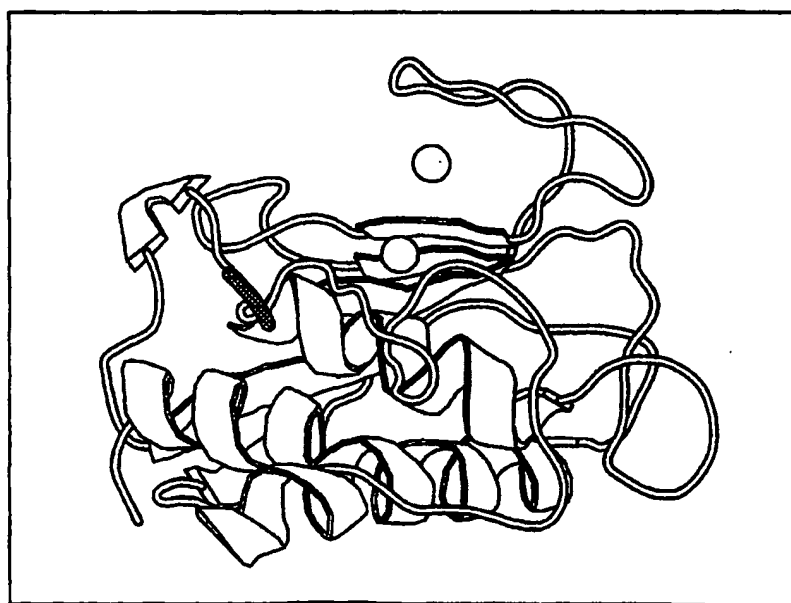


图 3

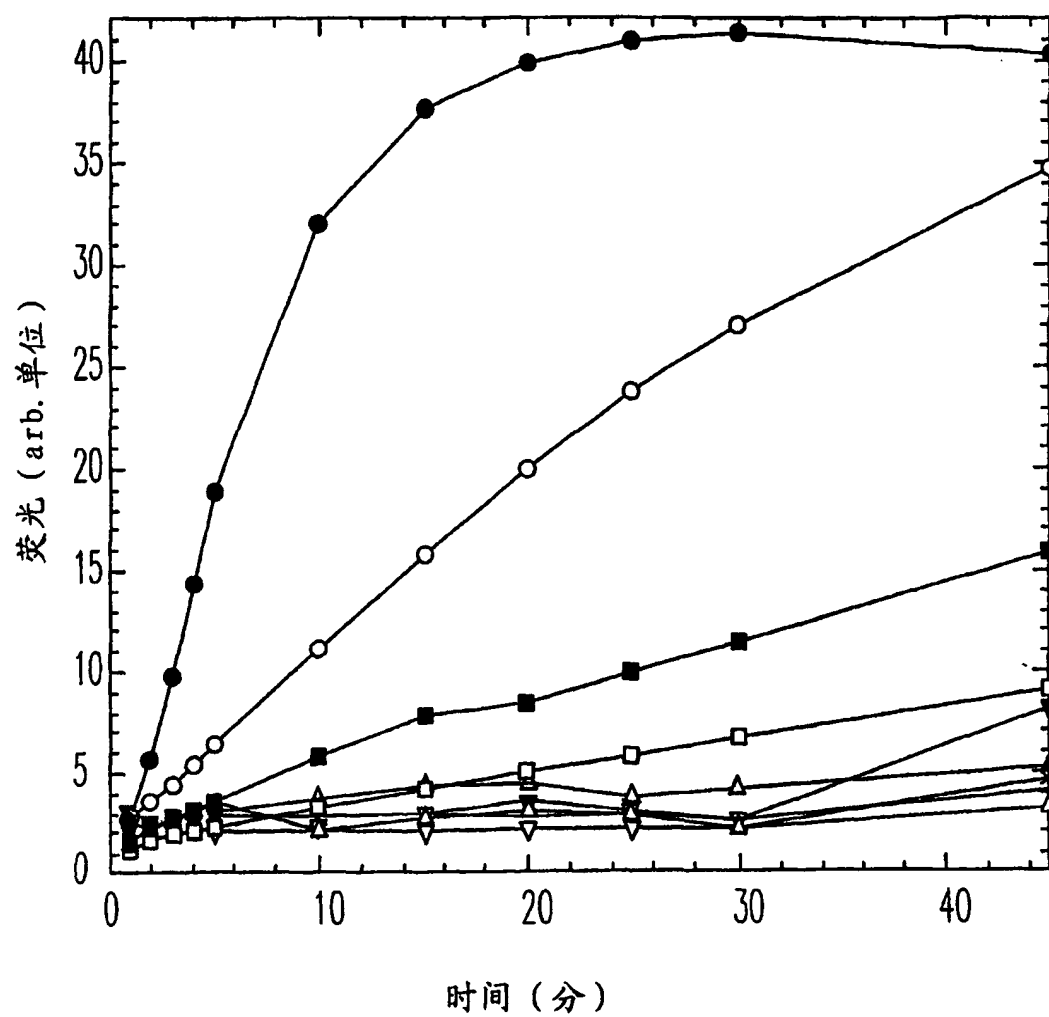


图 4

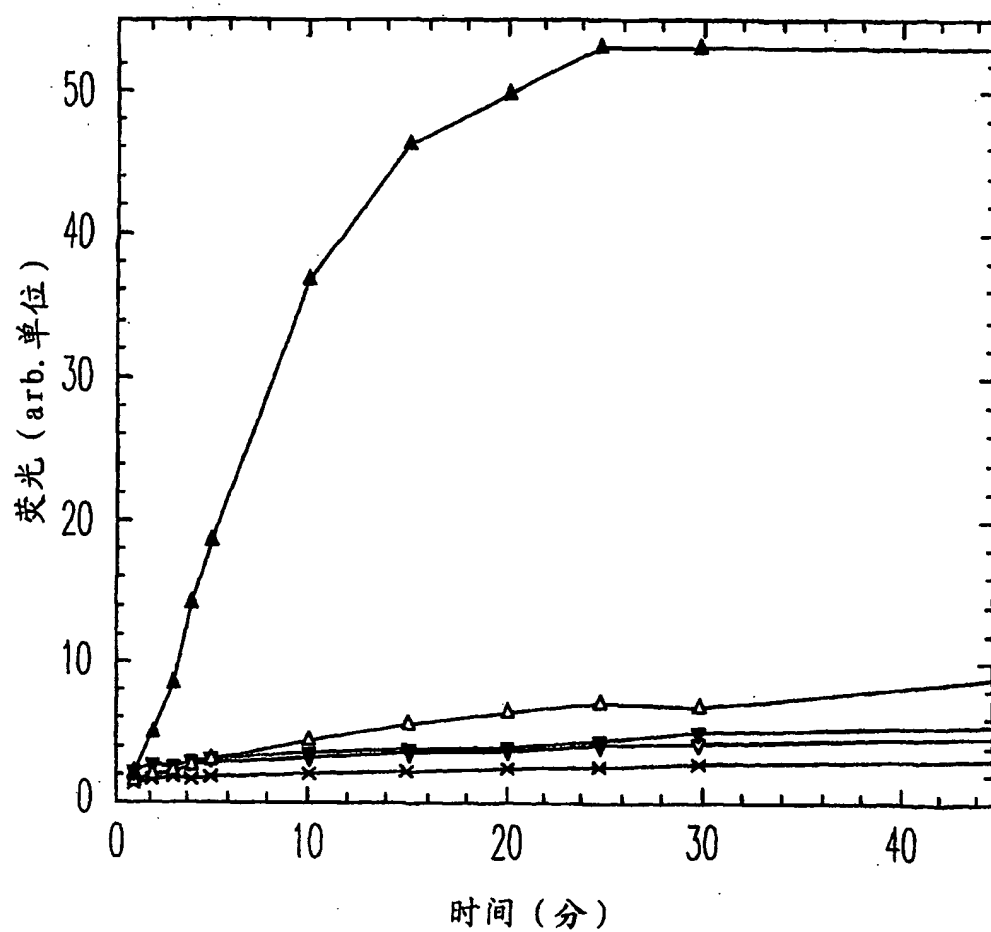


图 5

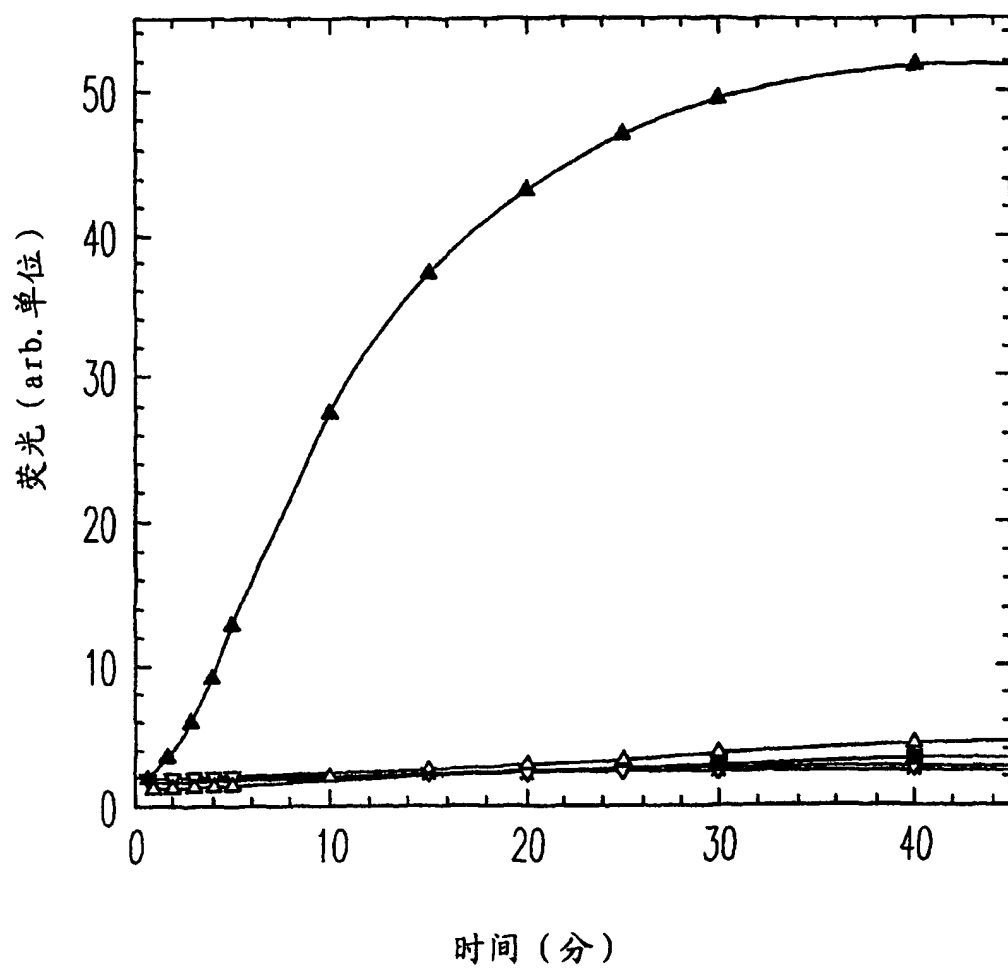


图 6



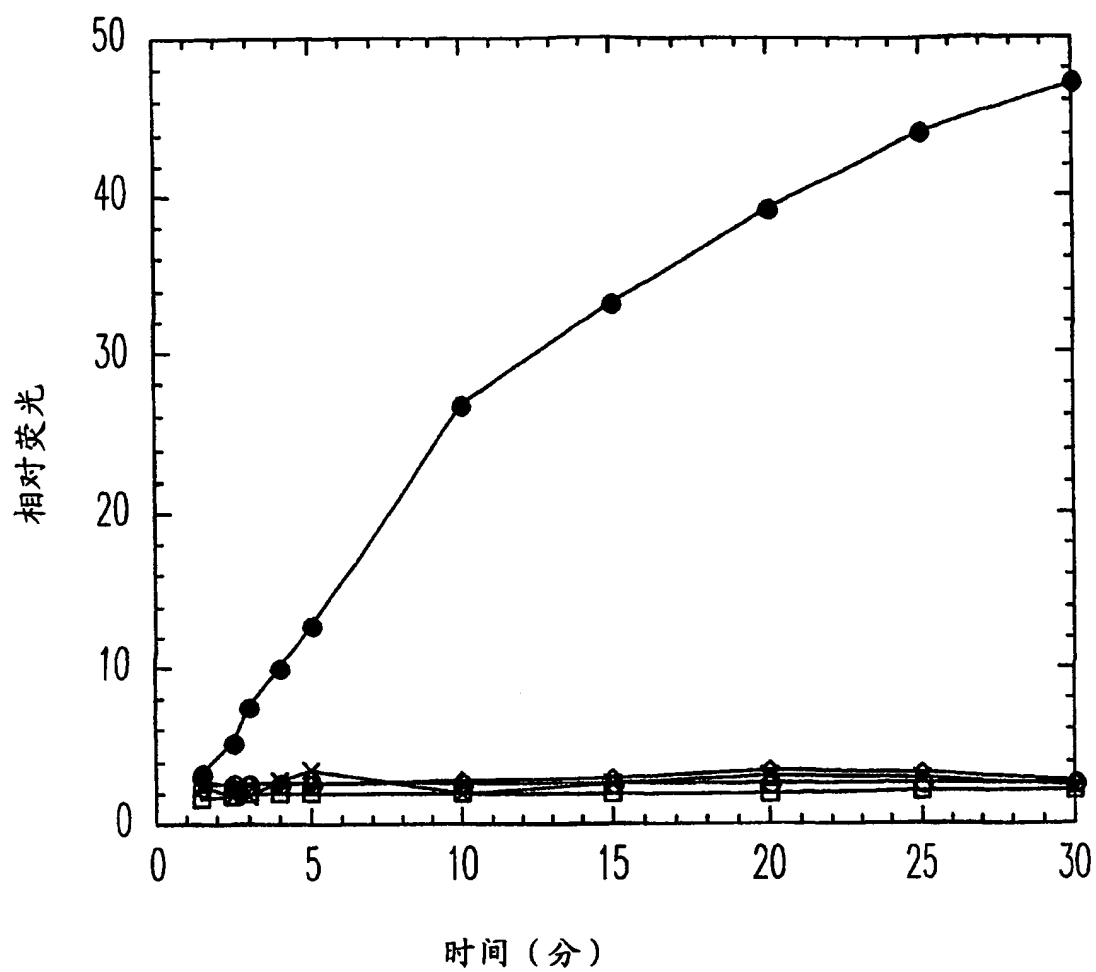


图 7

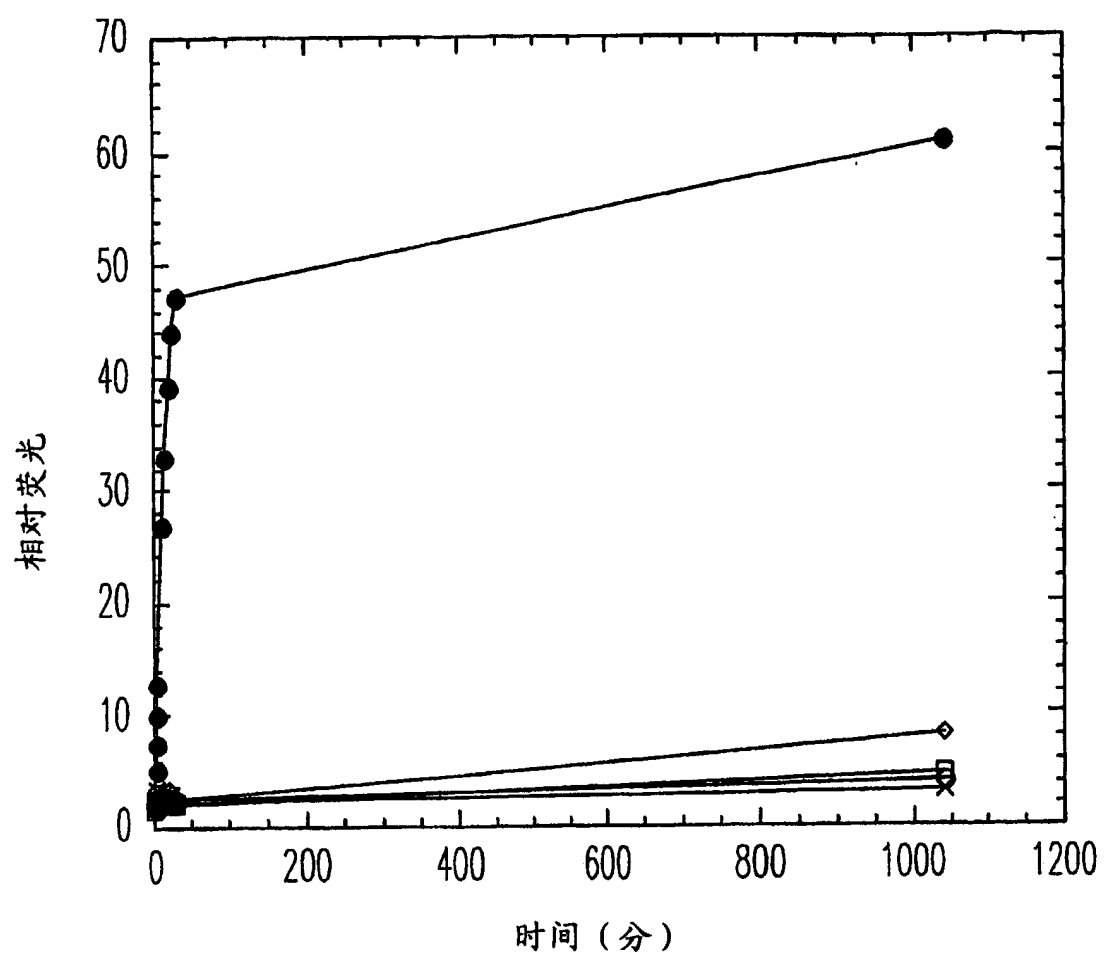


图 8

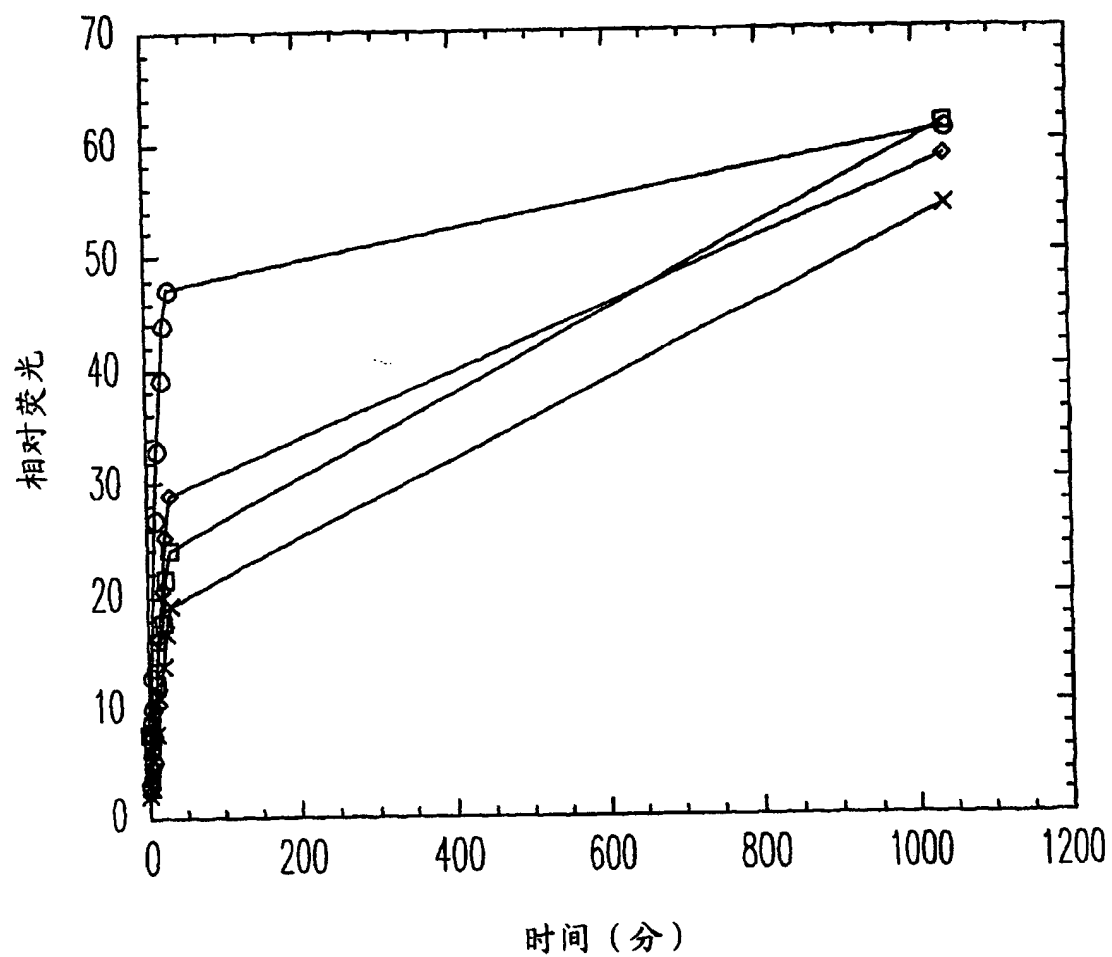


图 9

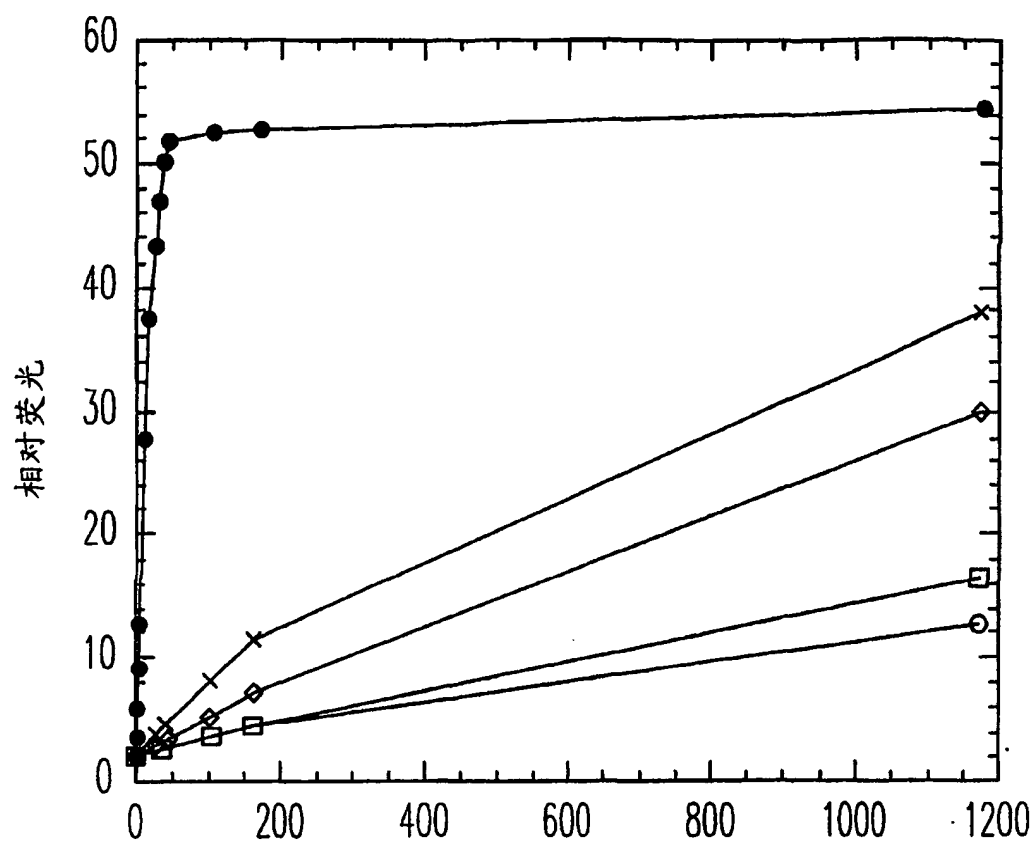


图 10

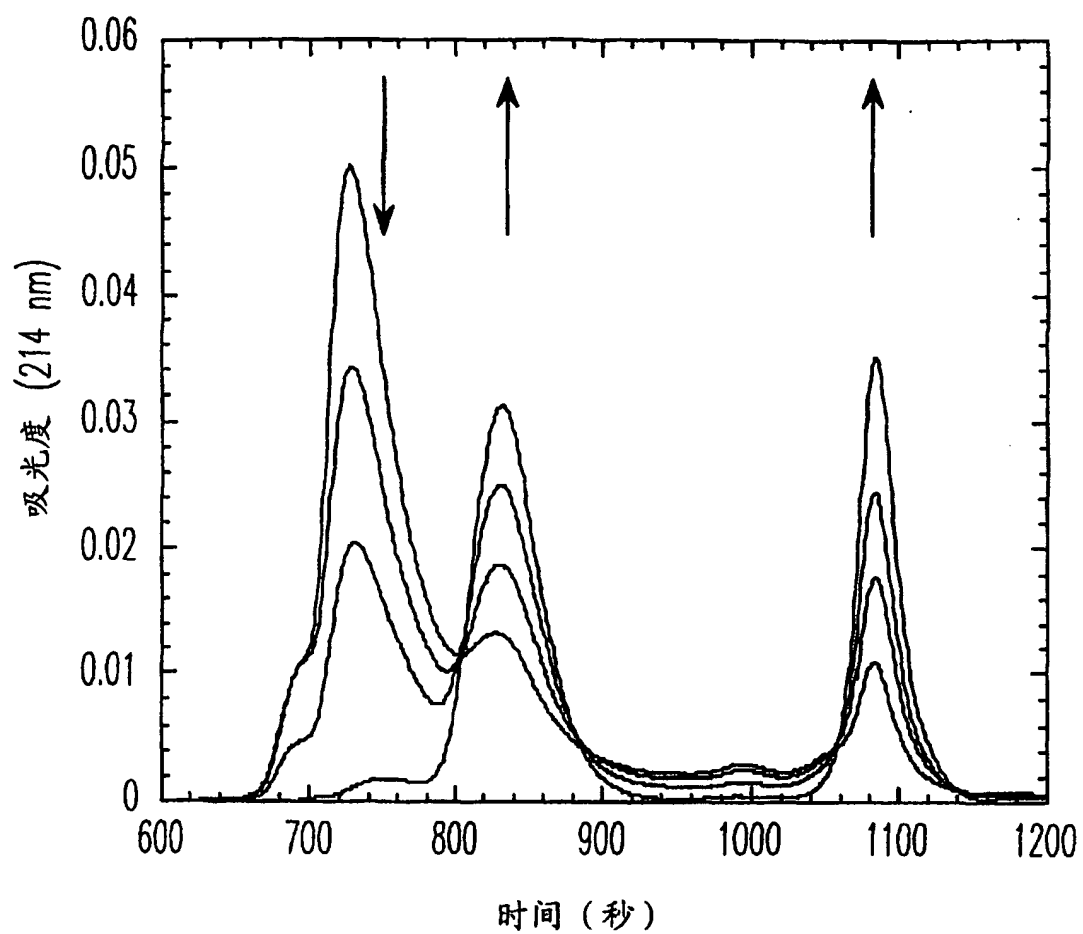


图 11

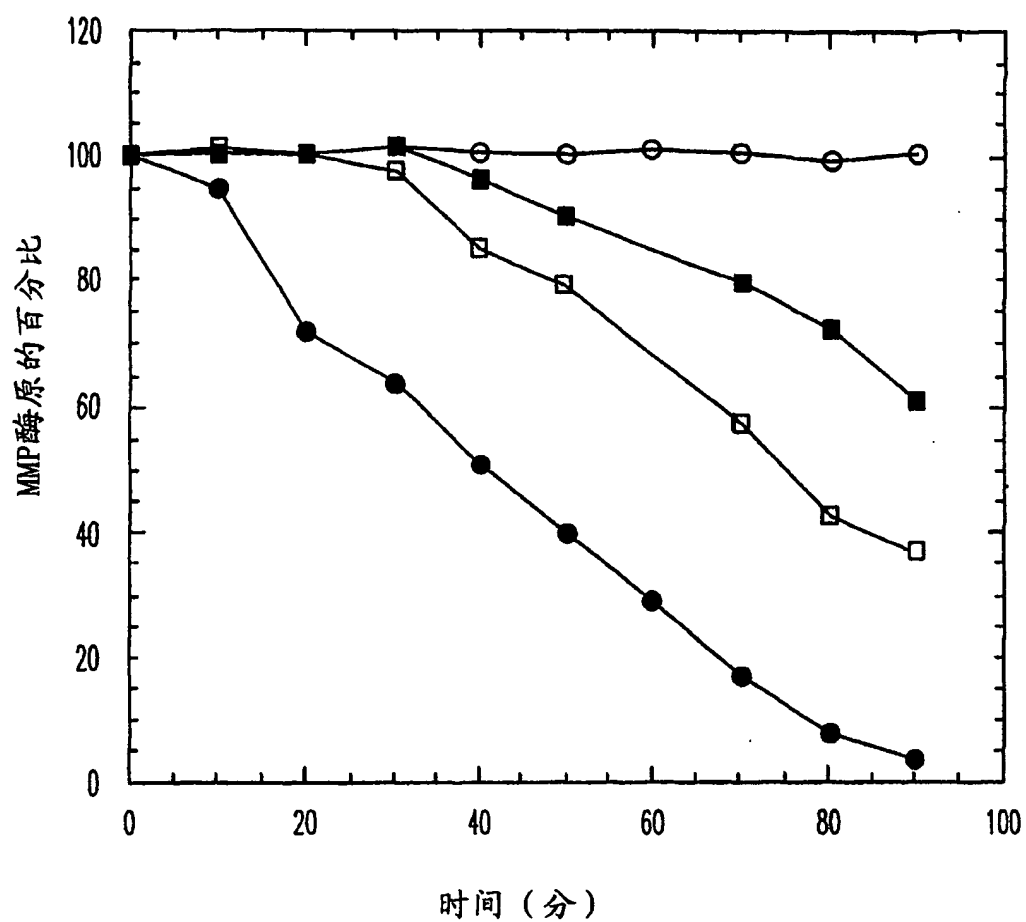


图 12

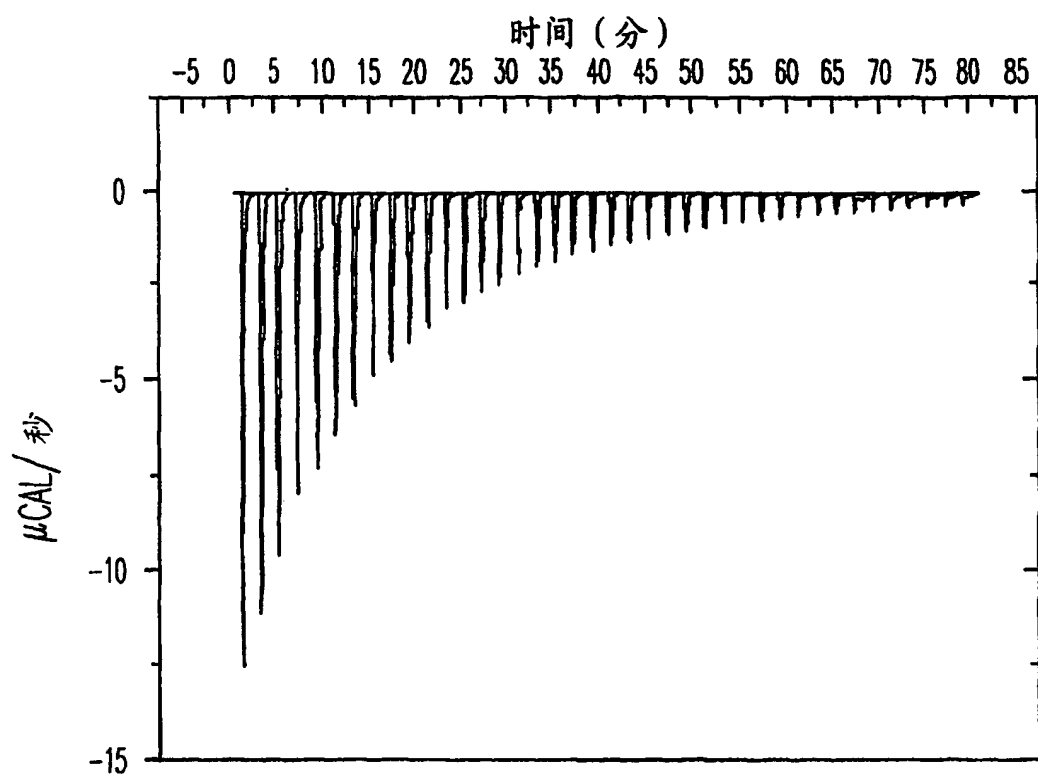


图 13A

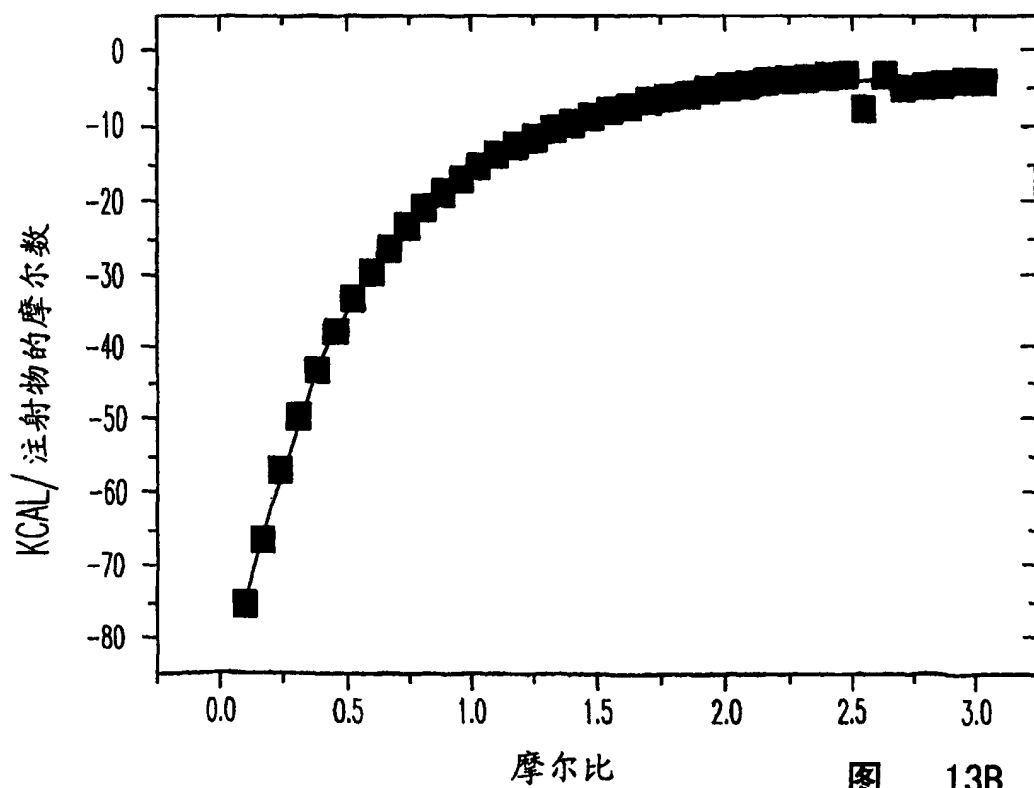


图 13B

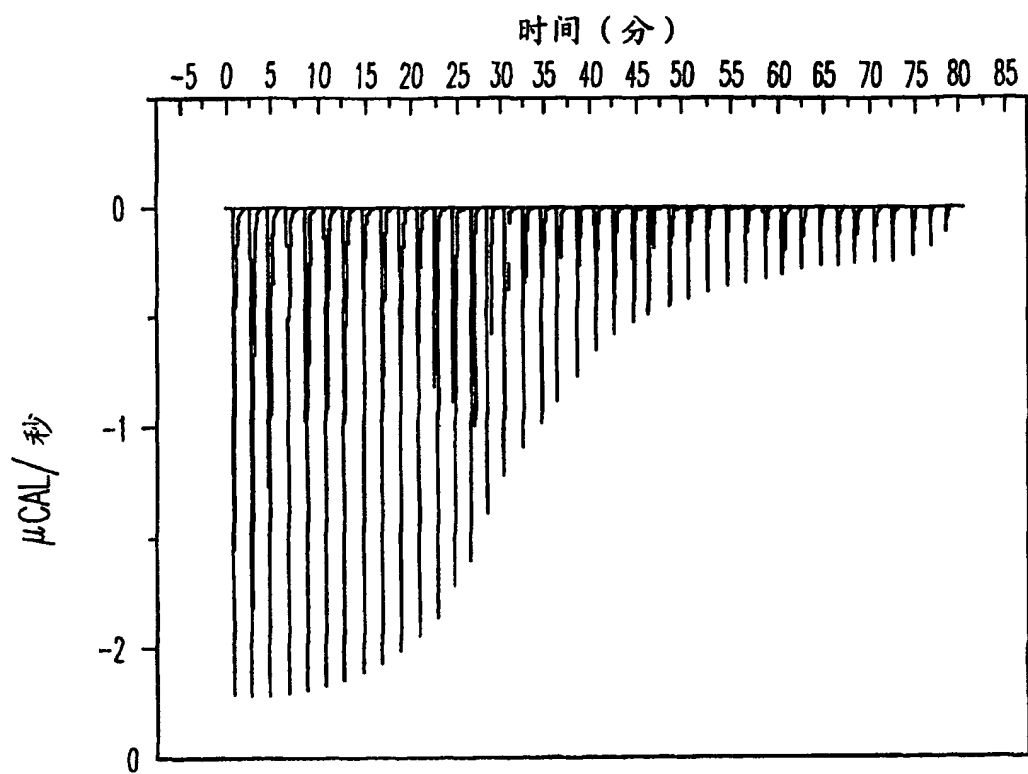


图 14A

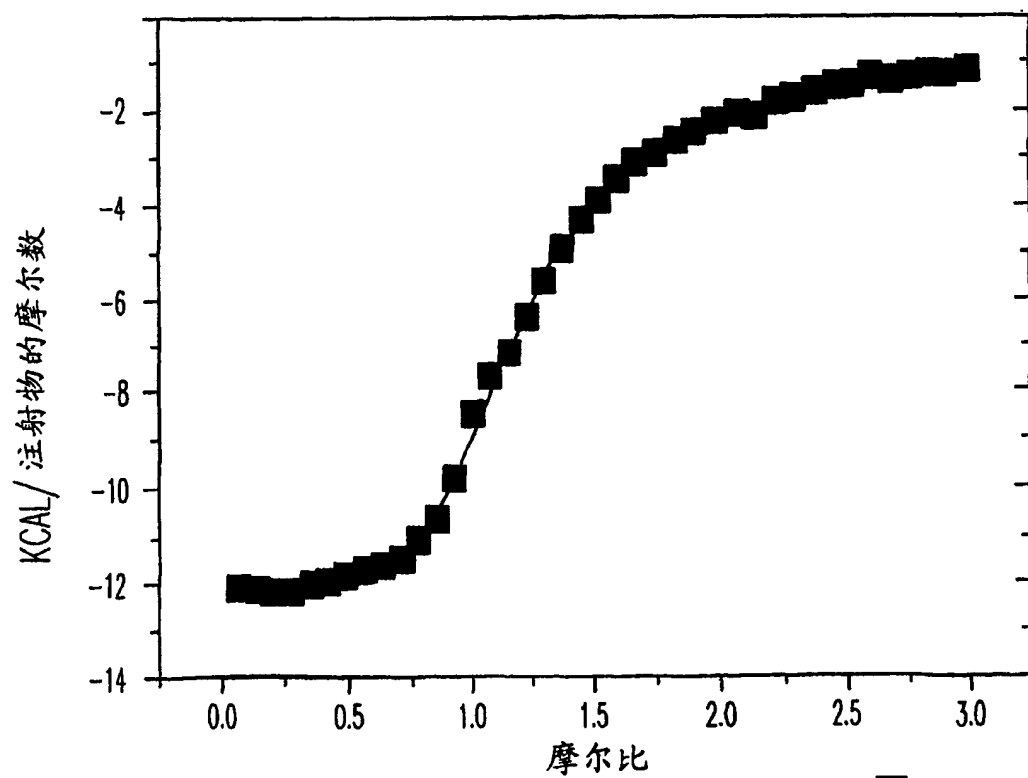


图 14B



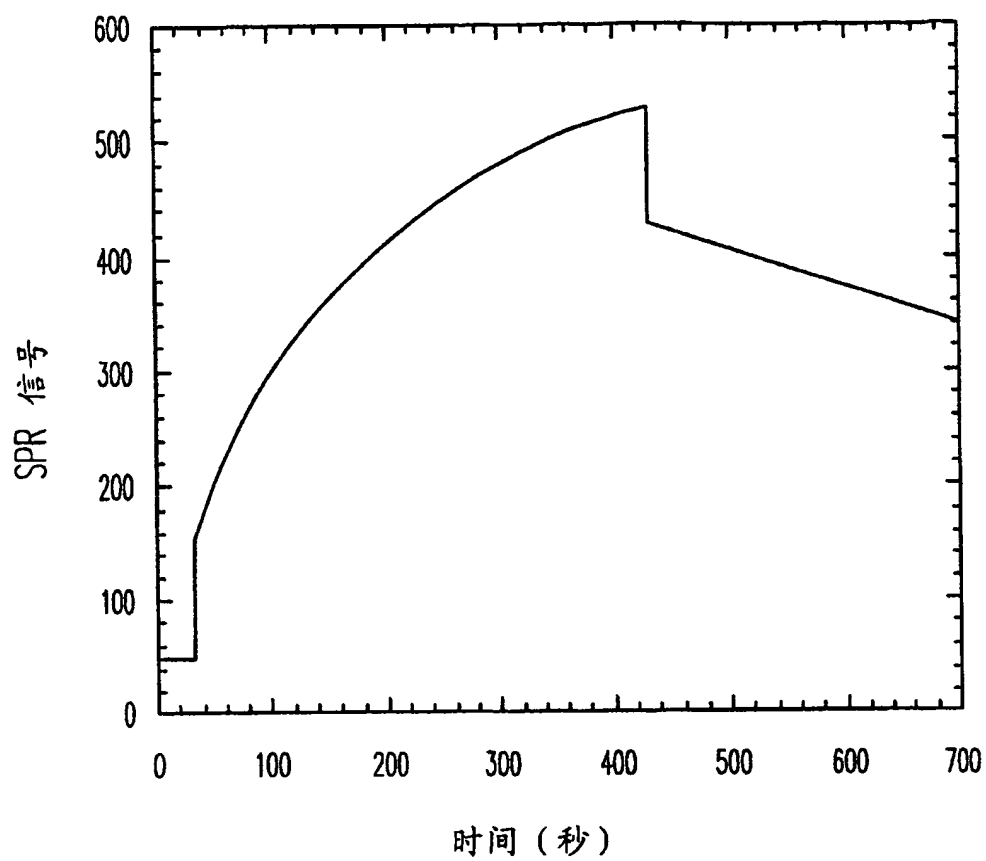


图 15

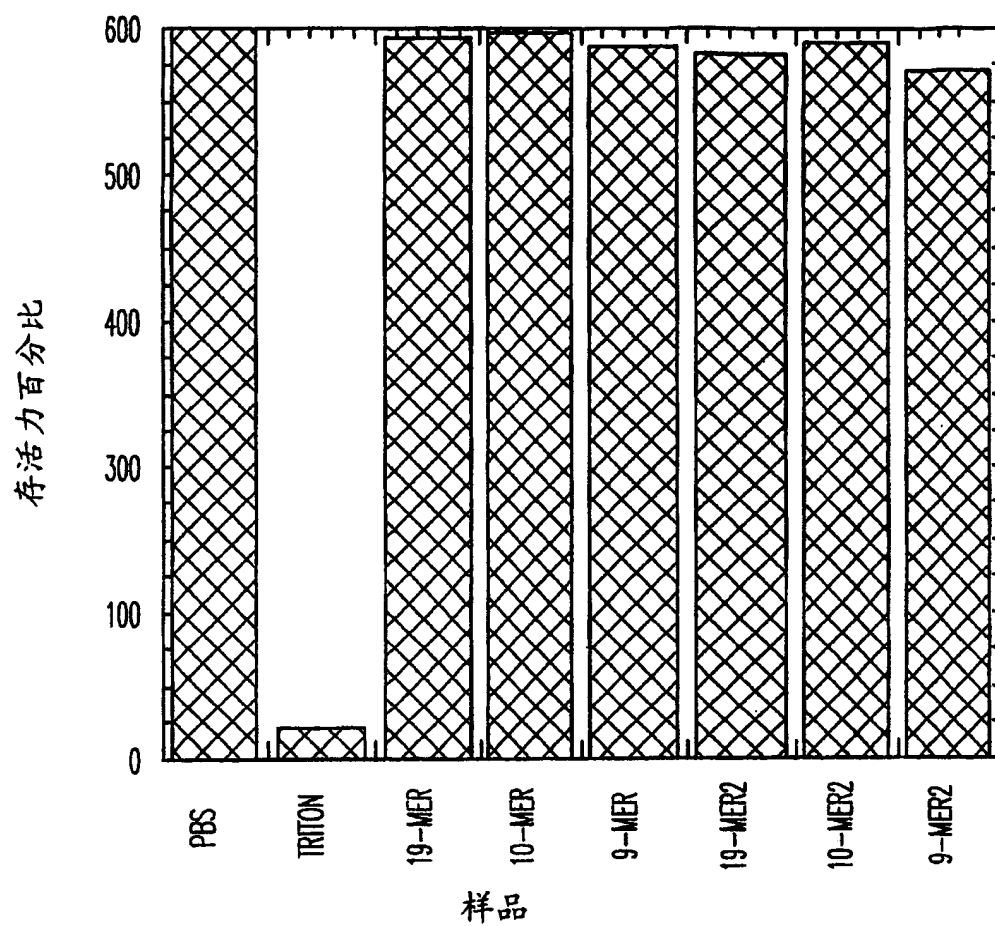


图 16

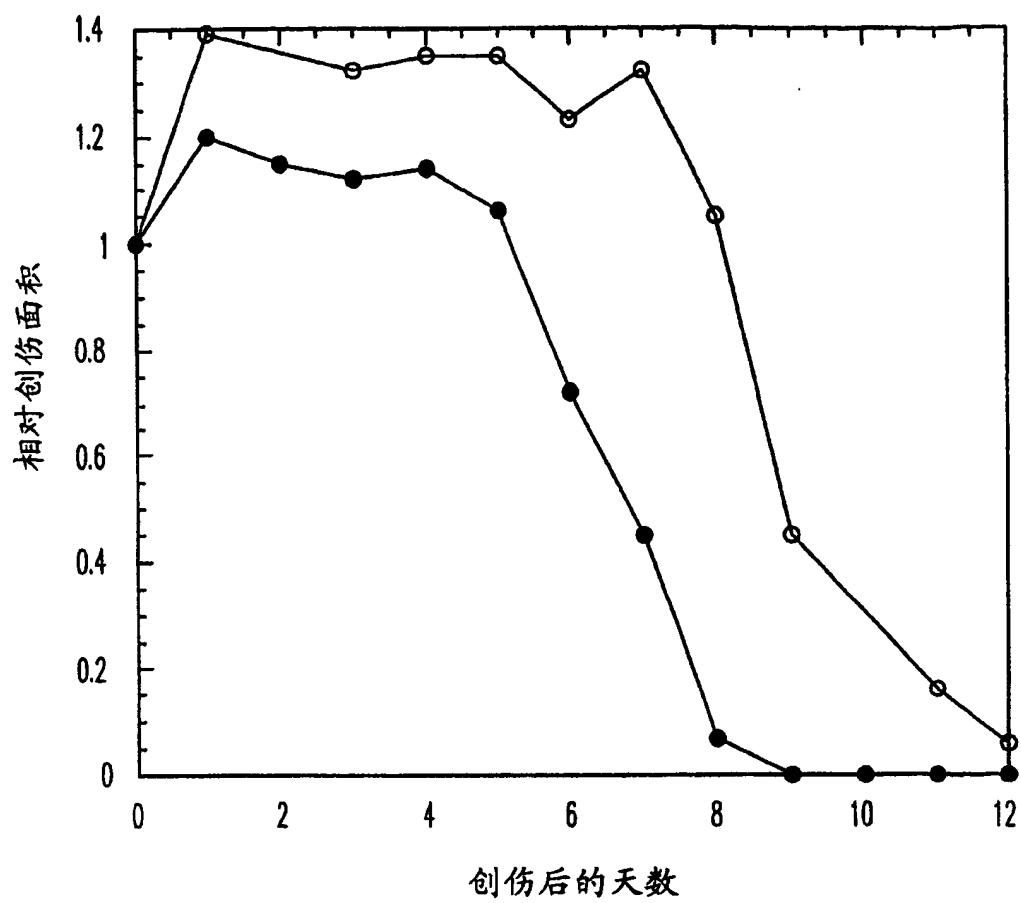


图 17

VEGF和 $\beta$ -肌动蛋白的PCR

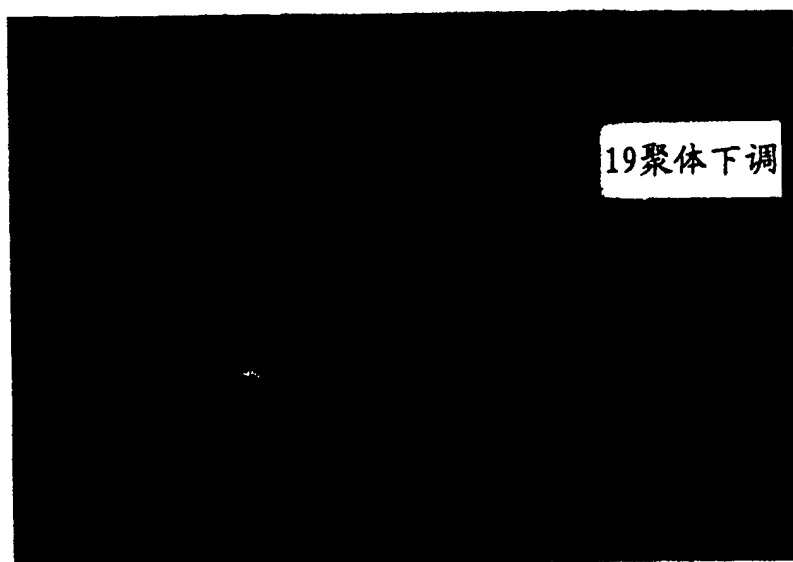
标记, 阴性对照, CoCl<sub>2</sub>, ODD, TAP, 19-聚体

图 18

VEGF和 $\beta$ -肌动蛋白的PCR

标记, 阴性对照, 阴性对照, Col2, Col2, TAP-ODD, TAP-ODD, 19, 19

图 19

$\beta$ -肌动蛋白和VEGF的PCR

标记, 引物混合物, 阴性对照, CoCl<sub>2</sub>, TAP, ODD, BP, 19-聚体

图 20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**